



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

MURIEL MAGDA LUSTOSA PIMENTEL

**XENOTRANSPLANTE OVARIANO CAPRINOS: EFEITOS DA VITRIFICAÇÃO,  
DO SEXO E DA LINHAGEM RECEPTORA**

MOSSORÓ

2018

MURIEL MAGDA LUSTOSA PIMENTEL

**XENOTRANSPLANTE OVARIANO CAPRINOS: EFEITOS DA VITRIFICAÇÃO,  
DO SEXO E DA LINHAGEM RECEPTORA**

Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra

MOSSORÓ

2018

©Todos os direitos estão reservados à Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade da autora, sendo a mesma, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996, e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata, exceto as pesquisas que estejam vinculadas ao processo de patenteamento. Esta investigação será base literária para novas pesquisas, desde que a obra e sua respectiva autora seja devidamente citada e mencionada aos seus créditos bibliográficos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)  
Setor de Informação e Referência (SIR)

PP644 Pimentel, Muriel Magda Lustosa .  
xx XENOTRANSPLANTE OVARIANO CAPRINOS: EFEITO DA  
VITRIFICAÇÃO, DO SEXO E DA LINHAGEM RECEPTORA /  
Muriel Magda Lustosa Pimentel. - 2018.  
71 f. : il.

Orientador: Marcelo Barbosa Bezerra.  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural  
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal, 2018.

1. Fetal. 2. Cabras. 3. Vitrificação. 4.  
Germoplasma. I. Bezerra, Marcelo Barbosa ,  
orient. II. Título.

Setor de Informação e Referência  
Bibliotecário-Documentalista  
Nome do profissional, Bib. Me. (CRB-15/10.000)

MURIEL MAGDA LUSTOSA PIMENTEL

**XENOTRANSPLANTE OVARIANO CAPRINOS: EFEITOS DA VITRIFICAÇÃO,  
DO SEXO E DA LINHAGEM RECEPTORA**

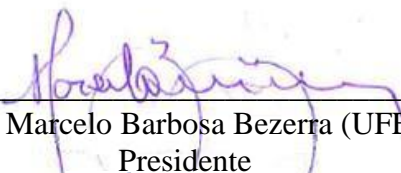
Tese apresentada ao Doutorado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

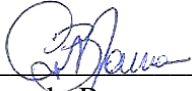
Linha de Pesquisa: Reprodução Animal

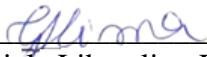
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra

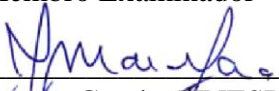
Defendida em: 30 / 10 / 2018


**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra (UFERSA)  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura (UFERSA)  
Membro Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Gabriela Liberalino Lima (IFCE)  
Membro Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia (UNESP/JABOTICABAL)  
Membro Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Saulo de Tarso Gusmão da Silva (UFRPE/UAG)  
Membro Examinador

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MURIEL MAGDA LUSTOSA PIMENTEL** – Nascida em Brasília-DF, no dia 29/01/1986, filha de Mario Sérgio Granado Pimentel e Lianeide Lustosa Pimentel, concluiu o ensino fundamental na Escola Estadual Governador Walfredo Gurgel e o ensino médio na Escola Estadual Professor Anísio Teixeira em Natal-RN. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) em 2012.1. Concluiu o mestrado em Ciência Animal pela UFERSA em 2015. Em março de 2015 foi selecionada pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela UFERSA, orientada pelo Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra. Durante o período de doutorado, desenvolveu trabalhos com transplantes gonadais e produção *in vitro* de embriões.

*Aos meus pais pelo apoio e amor incondicional*

## AGRADECIMENTOS

Ao Grande Arquiteto do Universo, pois sentir sua presença em minha vida me torna mais forte para continuar sabendo que Ele está sempre ao meu lado me amparando com a sua mão divina! Muitas vezes já me senti sozinha e perdida, mas daí paro e penso... “não estou sozinha, o Senhor está comigo em todo o momento”, mostrando a direção certa para seguir pelo melhor caminho! Acredito que somos vitoriosos pelo simples fato de estarmos vivos, por ganharmos uma nova oportunidade todos os dias de conquistar algo novo e de procurar ser melhor em todos os sentidos. Sou grata por todas as vitórias que já alcancei na minha vida, das mais difíceis àquelas mais simples, conquistadas todos os dias. E a cada obstáculo a vencer, tenho certeza, que o meu Deus estará sempre comigo em pensamentos, palavras e ações!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra, pela oportunidade e credibilidade que em mim confiou. Fiz e continuarei fazendo o meu melhor para que nossa equipe continue evoluindo, e vamos rumo ao embrião!

À toda equipe que me ajudou diretamente no experimento: Fernanda Santos, Luã Barbalho e Gabriela Liberalino, que me apoiaram em tudo e se sacrificaram muitas vezes em prol do experimento, e por me aguentarem até o final, pois sei que em dia de experimento, sou nervosa demais. “Juntos, somos mais fortes”.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Bezerra de Moura, pelos ensinamentos a mim passados desde a época da Zootecnia. Sempre bastante atencioso com seus alunos.

Aos professores José Domingues e Moacir Franco, pelo auxílio dado durante o período do experimento em seus Laboratórios de Histologia e de Morfofisiologia Animal Aplicada, respectivamente.

Ao meu pai, Mario Sérgio Granado Pimentel, por todo o apoio em todas as circunstâncias de minha vida. Ele sempre esteve ao meu lado, confiando e acreditando plenamente em tudo que fiz e faço, em tudo que apostei se daria certo. Nunca me esquecerei de suas palavras de carinho e afeto, “quem eu amo? E quem me ama?” e das palavras de apoio “faça o que fizer, estarei ao seu lado, e assino embaixo”. Apenas lhe digo, obrigada, eu amo você!

À minha mãe, Lianeide Lustosa Pimentel, que com sua força e determinação, mantém minha casa na santa paz divina. A ela, que sempre sacrificou tudo pelos filhos e que sempre rezou muito por todos nós! Muito obrigada de coração, te amo incondicionalmente.

Às minhas irmãs, Paula Pimentel e Myllena Porto, por sempre acreditarem e torcerem muito pelo meu sucesso.

À minha grande amiga, Fernanda Santos, pelo apoio integral, passando feriados e dias santos, me ajudando sempre em tudo, me aconselhando em todos os momentos. Desde que entrei no laboratório, a tive como exemplo de pessoa, por sua classe e perfeição, sabendo repassar tudo que sabia. Aprendemos juntas a crescer e desenvolver nossos trabalhos e a passar por todas as dificuldades com louvor. Tenho muito orgulho em ouvir várias pessoas dizendo, “nossa, como vocês são sempre positivas, achando um jeito e resposta para tudo”! Uma grande amiga e parceira de trabalho! Não tenho palavras para agradecer tamanho carinho.

Ao Luã Barbalho de Macêdo, por sempre estar ao meu lado, como amigo, namorado, companheiro fiel de todas as horas. Várias vezes me deu seu ombro amigo para chorar, e

mesmo distante, se fez presente em todos os momentos, com palavras de apoio e muito carinho. Tenho você como exemplo de honestidade, lealdade e sensatez a ser seguido e espero poder contribuir tudo que já fez, faz e sei que ainda fará por mim. Te amo.

À Kelly Ribas, pela amizade sincera e pelo apoio que sempre vêm me dando psicologicamente. Obrigada!

À todos que, direta ou indiretamente, me ajudaram, apoiaram, acreditaram! Meus mais sinceros agradecimentos!

Ao Centro Universitário Cesmac por estar sendo minha segunda casa, minha família e meu trabalho. Agradeço à todos os colegas que me acolheram e me apoiam nesta fase.

Aos animais de meu experimento (*in memoriam*), pois sem eles, nada disso seria possível. Todos foram utilizados com muito carinho, ética e respeito que todo animal, seja ele como for, devemos ter.



“Grandes batalhas só são dadas a grandes guerreiros”.

Mahatma Gandhi

**XENOTRANSPLANTE OVARIANO CAPRINOS: EFEITOS DA VITRIFICAÇÃO, DO SEXO E DA LINHAGEM RECEPTORA**, PIMENTEL, Muriel Magda Lustosa. Xenotransplante ovariano de caprino em duas linhagens de camundongos imunodeficientes (BALB/c Nude e C57BL6 SCID), 2018. 64f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Produção e Sanidade Animal) Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2018.

## RESUMO

O xenotransplante de tecido ovariano representa uma ferramenta interessante para investigar o potencial reprodutivo em diferentes mamíferos domésticos, no entanto sua aplicabilidade em caprinos ainda necessita ser estudada. O objetivo deste estudo foi avaliar o aproveitamento de tecido ovariano caprino transplantado em duas linhagens de camundongos imunossuprimidos (C57BL/6 SCID e BALB/c Nude). Para o primeiro experimento, ovários de fetos caprinos foram colhidos após o abate de suas genitoras, divididos em pequenos fragmentos que foram destinados a avaliação controle, ao xenotransplante a fresco (XF) e xenotransplante após criopreservação (XC). Foram utilizadas cinco receptoras de cada linhagem para o xenotransplante a fresco e 10 animais de cada linhagem para o xenotransplante criopreservado. As camundongas receptoras foram eutanasiadas após 65 dias de pós-operatório, sendo coletados os transplantes para avaliação macro e microscópicas e o sangue coletado por punção via intracárdica para mensuração de estradiol. Para o segundo experimento, fragmentos ovarianos (1,0 mm<sup>3</sup>) de seis cabritas jovens foram xenotransplantados imediatamente após a colheita para dez receptores de cada linhagem. Após 65 dias do xenotransplante, os animais foram eutanasiados e os transplantes avaliados quanto às características macroscópicas por histologia clássica e o desenvolvimento oocitário *in vitro*. Adicionalmente, o plasma sanguíneo foi recuperado dos receptores para a quantificação das concentrações de estradiol e análises bioquímicas renais e hepáticas. No primeiro experimento observou-se que, independente das linhagens, todas as receptoras apresentaram taxa de retorno a atividade ovariana com ciclo estral completo após XF e 80% após XC. Foram observados folículos pré antrais e antrais e sem alterações morfológicas. A densidade de volume e a superfície total de vasos observados nos transplantes foram diferentes ( $p < 0,01$ ) entre os grupos XF e XC. A dosagem de 17 $\beta$ - estradiol nas receptoras não diferiu ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. No segundo experimento foi observado folículos de todas as fases de desenvolvimento e sem alterações morfológicas nos transplantes recuperados. Além disso, em receptor BALB/c Nude, um oócito recuperado e submetido a maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, sem contudo apresentar desenvolvimento embrionário. Nenhuma diferença foi observada nas dosagens bioquímicas mas houve diferenças nas concentração de 17 $\beta$  - estradiol entre as linhagens C57BL6 SCID e BALB/c Nude e seus respectivos controles. Pode-se observar que é possível ativar os folículos pré-antrais dos ovários de caprinos otimizando o aproveitamento e conservação do germoplasma de caprinos em camundongos imunossuprimidos das linhagens C57BL/6 SCID e BALB/c Nude, gonadectomizados independente do gênero.

**Palavras-chave:** Fetal. Cabras. Vitrificação. Germoplasma.

**XENOTRANSPLANTATION OF GOATS OVARIES: EFFECTS OF VITRIFICATION, SEX AND STRAINS,** PIMENTEL, Muriel Magda Lustosa. Xenotransplante ovariano de caprino em duas linhagens de camundongos imunodeficientes (BALB/c Nude e C57BL6 SCID), 2018. 64f. Tese (Doutorado em Ciência Animal, Produção e Sanidade Animal) Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2018.

### **ABSTRACT**

The ovarian tissue xenotransplantation represents a promising tool to investigate the reproductive potential in different domestic mammals, however its applicability in goats still needs to be more studied. The aim of this study was to evaluate the use of transplanted goat ovarian tissue in two immunosuppressed mice (C57BL/6 SCID and BALB/c Nude). For the first experiment, ovaries of goat fetuses were collected after the slaughter of their mother, fragmented and destined to the control evaluation, to fresh xenotransplantation (XF) and xenotransplantation after cryopreservation (XC). Five recipients from each line were used for fresh xenotransplantation and 10 animals from each line for cryopreserved xenotransplantation. The recipient mice were euthanized after 65 days of post-surgery, transplants being collected for macro and microscopic assessment and blood was collected via intracardiac puncture for measurement of estradiol. For the second experiment, ovarian fragments (1.0 mm<sup>3</sup>) of six young goats were xenotransplanted immediately after harvesting to ten recipients of each lineage. After 65 days of xenotransplantation, the animals were euthanized and the transplants evaluated for macroscopic characteristics, histologic sections and oocyte development in vitro. Additionally, blood plasma was recovered from the recipients for the quantification of estradiol levels and renal and hepatic biochemical analyzes. In the first experiment, it was observed that regardless of the lineages, all the recipients presented return to ovarian activity with complete estrous cycle after XF and 80% after XC. Follicles were observed at all stages of development and without morphological changes. The volume density and total vessel surface observed in the transplants were different ( $p < 0.01$ ) between the XF and XC groups. The dose of 17 $\beta$ -estradiol in the recipients did not differ ( $p < 0.05$ ) between the treatments. In the second experiment, we observed preantral and antral follicles without morphological changes in the recovered transplants. Moreover, in a BALB/c Nude recipient, an oocyte recovered and submitted to maturation, fertilization and in vitro culture, without however presenting embryonic development. No differences were observed in the biochemical dosages but there were differences in 17 $\beta$ -estradiol concentration between the C57BL6 SCID and BALB/c Nude and their respective controls. It can be concluded that it is possible to activate the preantral follicles of the ovaries of goats by optimizing the use and conservation of goat germplasm in immunosuppressed mice of the C57BL / 6 SCID and BALB / c Nude, gonadectomized and independently of gender

Keywords: Fetal. Goats. Vitrification. Conservation of germplasm.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2:

- Figura 1 – Fragmento ovariano de feto de cabra xenotransplantado na região subcapsular renal de camundongas com sobreposição do grid utilizado para determinação da densidade da superfície de volume dos vasos sanguíneos do fragmento..... 37
- Figura 2 – Fragmento de córtex ovariano de feto de cabra coletado após 65 dias da realização do xenotransplante em receptoras imunossuprimidas (A), demonstrando o desenvolvimento ovariano sob a cápsula renal (B) ..... 38
- Figura 3 – Padrão citológico do lavado vaginal de camundongas imunossuprimidas após xenotransplante..... 39
- Figura 4 – Fotomicrografia de ovário de feto de cabra após o xenotransplante ovariano a fresco em receptoras imunossuprimidas..... 40
- Figura 5 – Fotomicrografia de ovário de feto de cabra avaliando a vascularização após o xenotransplante ovariano em receptoras imunossuprimidas..... 41

### CAPÍTULO 3:

- Figura 1 – Macroscopia dos fragmentos de córtex ovariano de cabra antes, durante e após o procedimento de xenotransplante..... 56
- Figura 2 – Fotomicrografias de ovário caprino antes e após o xenotransplante em receptores machos imunodeficientes usando coloração de hematoxilina-eosina..... 57
- Figura 3 – Fotomicrografia de vasos sanguíneos observados no tecido ovariano caprino após xenotransplante em receptores machos usando coloração de tricrômico de Masson..... 58
- Figura 4 – Cultivo *in vitro* de um oócito recuperado após xenotransplante de tecido ovariano caprino em receptores masculinos imunodeficientes..... 59

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2:

Tabela 1 – Média e desvio padrão (horas) da duração das fases do primeiro ciclo estral dos diferentes grupos experimentais.....	39
Tabela 2 – Proporção folicular (%) do xenotransplante de ovário de feto caprino sob a cápsula renal de camundongas da linhagem C56BL6 SCID e BALB/c Nude.....	40
Tabela 3 – Efeito da vitrificação sobre o volume do xenotransplante ovariano, densidade de volume (Vv), de área dos vasos (Sv) .....	42
Tabela 4 – Concentração sérica de 17 $\beta$ - estradiol após xenotransplante de ovário de feto caprino sob a cápsula renal de camundongas C56BL6 SCID e BALB/c Nude.....	42

### CAPÍTULO 3:

Tabela 1 – Valores plasmáticos da função renal e hepática de camundongos imunodeficientes submetidos ou não ao xenotransplante ovariano caprino.....	55
Tabela 2 – Concentração plasmática média de 17 $\beta$ - estradiol em camundongos SCID e Nude após xenotransplante de tecido ovariano caprino sob a cápsula renal (P > 0,05) .....	55
Tabela 3 – Proporção folicular (%) de xenotransplante de ovário de caprino sob a cápsula renal de camundongos machos da linhagem C56BL6 SCID e BALB-C NUDE .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato Aminotransferase
BSA	Bovine Serum Albumins
CCOs	Complexos cumulus-oócito
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COBEA	Código Brasileiro de Experimentação Animal
CR	Creatinina
CR2	Charles Rosenkrans 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2	Estradiol
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EUA	Estados Unidos da América
FA	Folículo antral
FAL	Fosfatase alcalina
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
HE	Hematoxilina-eosina
HHG	Hipotalâmico-hipofisário-gonadal
IA	Inseminação artificial
LH	Hormônio luteinizante
LN2	Nitrogênio líquido
MEM	Meio Essencial Mínimo
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
NaCl	Cloreto de sódio
OVL	Ovariectomia por videolaparoscópica
P	Folículo primário
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PAS	Ácido periódico-Schiff
PBS	Tampão fosfato-salino
pp	Folículo primordial
R	Parênquima renal
S	Folículo secundário
SFB	Soro fetal bovino
SUC	Sacarose
Sv	Área dos vasos

TALP-HEPES	Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate
TC	Tecido conjuntivo
TCM199	Meio de Cultivo Tecidual 199
TM	Tricrômico de Masson
UR	Ureia
VS	Solução de vitrificação
Vv	Densidade de volume
XC	Xenotransplante após criopreservação
XF	Xenotransplante a fresco

## LISTA DE SÍMBOLOS

©	Copyright
®	Marca registrada
%	Porcentagem
pg/mL	Picograma por mililitro
mL	Mililitro
mm <sup>3</sup>	Milímetro cubico
°C	Grau Celsius
mol/L	Mol por litro
mL/kg	Mililitro por quilo
μL	Microlitro
g	Grama
μm	Micrometro
μm <sup>2</sup>	Micrometro quadrados
Σp	Somatório dos pontos
I(p)	Comprimento da reta
β	Beta



## SUMÁRIO

<b>1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1. Introdução .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2. Referencial Teórico.....</b>	<b>19</b>
1.2.1. Principais avanços nas biotecnias em caprinos.....	19
1.2.2. Xenotransplante ovariano.....	21
1.2.2.1 Desenvolvimento folicular e neovascularização.....	21
1.2.2.2. Estimulo hormonal associado ao xenotransplante.....	23
1.2.2.3. Associação de biotécnicas reprodutivas para fins de conservação.....	24
1.2.3. Receptores para o xenotransplante.....	25
1.2.4. Considerações finais	26
1.2.5. Objetivos.....	26
1.2.5.1. Objetivo geral.....	26
1.2.5.2. Objetivos específicos.....	26
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>27</b>
<b>2. CAPÍTULO 2 – ATIVAÇÃO FOLICULAR EM FRAGMENTOS DE OVÁRIO DE FETO CAPRINO TRANSPLANTADO EM DUAS LINHAGENS.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1. Resumo.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2. Introdução.....</b>	<b>34</b>
<b>2.3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>35</b>
2.3.1. Doadoras dos ovários.....	35
2.3.2. Criopreservação dos fragmentos corticais.....	35
2.3.3. Receptoras.....	36
2.3.4. Xenotransplante.....	36
2.3.5. Lavado vaginal.....	36
2.3.6. Dosagem hormonal.....	37
2.3.7. Processamento histológico e avaliação.....	37
2.3.8. Análise estereológica da vascularização.....	38
2.3.9. Análise dos resultados.....	39
<b>2.4. Resultados.....</b>	<b>39</b>
2.4.1. Achados macroscópicos.....	39
2.4.2. Achados microscópicos.....	40
2.4.2.1. Avaliação do lavado vaginal.....	40
2.4.2.2. Morfologia dos folículos pré-antrais e antrais.....	41
2.4.2.3. Proporção folicular.....	42
2.4.2.4. Suprimento vascular para o tecido transplantado.....	42
2.4.2.5. Estudo estereológico dos vasos sanguíneos.....	43

2.4.2.6. Dosagem hormonal.....	43
<b>2.5. Discussão.....</b>	44
<b>2.6. Conclusão.....</b>	47
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	48
<b>3. CAPÍTULO 3 – RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS DE TECIDO OVARIANO CAPRINO XENOENXERTADO SOB CÁPSULA RENAL DE DOIS MODELOS DE CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES RECEPTORES DO SEXO MASCULINO.....</b>	52
<b>3.1. Resumo.....</b>	52
<b>3.2. Introdução.....</b>	53
<b>3.3. Materiais E Métodos.....</b>	54
3.3.1. Colheita de tecido ovariano caprino.....	54
3.3.2. Camundongos receptores e xenotransplante.....	54
3.3.3. Avaliação bioquímica renal e hepática e ensaio hormonal.....	55
3.3.4. Processamento histológico e avaliações macroscópicas e microscópicas.....	55
3.3.5. Recuperação e cultivo <i>in vitro</i> oocitário.....	56
3.3.6. Análise estatística.....	56
<b>3.4. Resultados .....</b>	56
3.4.1. Avaliação bioquímica sérica e hormonal.....	56
3.4.2. Avaliações macroscópicas.....	57
3.4.3. Avaliações microscópicas.....	58
3.4.4. Recuperação e cultivo <i>in vitro</i> oocitário.....	60
<b>3.5. Discussão.....</b>	61
<b>3.6. Conclusão.....</b>	64
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	65
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b>	68
<b>Anexos</b>	69
<b>Anexo 1 - Comunicado da Submissão do 1º Artigo/Capítulo 2</b>	70
<b>Anexo 2 - Comunicado da Submissão do 2º Artigo/Capítulo 3</b>	71

## 1. CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1. Introdução

Ao longo do último século, temos enfrentado um rápido e contínuo declínio de espécies de mamíferos selvagens e uma diminuição indiscriminada de raças de animais de fazenda. Uma em cada quatro espécies de mamíferos está ameaçada em todo o mundo (IUCN, 2016), a cada semana uma média de duas raças domésticas está sendo perdida (FAO, 2009).

Um número crescente de estudos vem associando a espécie caprina com biotécnicas reprodutivas comercialmente estabelecidas, visando incrementar a produtividade destes animais em programas de melhoramento genético, como também, para servir como modelo experimental para estudo em espécies selvagens (DONFACK et al., 2018). Apesar dos avanços no manejo reprodutivo para programas de melhoramento, pouco se sabe sobre a fisiologia reprodutiva de espécies individuais de mamíferos silvestres, além disso, o uso potencial de biotecnologias reprodutivas para salvar espécies selvagens ameaçadas teve sucesso parcial (SANTOS et al., 2010). Os principais fatores limitantes são a falta de conhecimento sobre a biologia reprodutiva básica dessas espécies, a ausência de protocolos padrões para preservar o material genético feminino e as diferenças de cada espécie. Para preservar a diversidade genética, principalmente para a conservação de espécies ameaçadas de extinção e de raças autóctones, é essencial criar genomas ou bancos de recursos genéticos (GRBs) de gametas masculinos, femininos e embriões (WILDT, 2000) e criopreservar gônadas para que posteriormente possam ser realizadas técnicas como o xenotransplante, para recuperação desse material genético.

O desenvolvimento normal e a diferenciação do ovário determinam o potencial reprodutivo da fêmea. O córtex ovariano contém milhares a milhões de folículos primordiais que podem permanecer viáveis mesmo várias horas após a morte do animal (SILVA et al., 2015). Esses folículos poderiam ser recuperados e criopreservados com sucesso para futuros xenotransplantes (PARIS et al., 2004) ou cultivo *in vitro* (AMORIM et al., 2003) a fim de obter oócitos fertilizáveis maduros. Assim, o xenotransplante ovariano pode ser utilizado para recuperação da atividade gametogênica e endócrina, bem como em estudos sobre desenvolvimento tecidual, síntese de hormônios, produção, desenvolvimento e maturação de gametas (a depender do sexo) e, finalmente, a produção de descendência (BEZERRA et al., 2014).

Há relatos de sucesso sobre o desenvolvimento ovariano por meio do xenotransplante em camundongos (CANDY et al., 2000; GUNASENA et al., 1997), ratas (SNOW et al., 2002; WANG et al., 2002), coelhos (ALMODIN et al., 2004), vacas (SENBON et al., 2003), ovelhas (GOSDEN et al., 1994), cutias (PRAXEDES et al., 2018), elefantes (WIEDEMAN et al., 2012), porcas (KANEKO et al., 2013), cangurus (MATTISKE et al., 2002), vombates (WOLVEKAMP et al., 2001), cadelas (METCALFE et al., 2001), gatas (DOS SANTOS et al., 2016), leoa (WIEDEMANN et al., 2012) e humanos (OKTAY et al., 1998), que mostram claramente o potencial desta tecnologia.

Além disso, para garantir o sucesso de todas as etapas do xenotransplante, é necessária a definição do local do transplante (AERTS et al., 2008; KANEKO et al., 2013; YANG et al., 2006; YOUM et al., 2014), bem como das características da linhagem receptora, como o gênero, realização de castração e imunossupressão induzida ou genética (HERNANDEZ-FONSECA et al., 2004).

Baseado nos aspectos mencionados acima, este estudo procurou avaliar o desenvolvimento e viabilidade do tecido ovariano caprino, na fase fetal e na fase pré-pubere, xenotransplantado a fresco ou após criopreservado, em diferentes linhagens e sexo de camundongos imunossuprimidos.

## **1.2. Referencial Teórico**

### **1.2.1. Principais avanços nas biotecnias em caprinos**

Desde sua domesticação, a espécie caprina vem ocupando um papel cada vez mais importante na exploração e produção de alimentos (RUPP et al., 2016). Esses animais possuem uma alta capacidade de adaptação a condições adversas sendo encontrados em todos os ambientes agroecológicos (HALDAR; GHOSH, 2015), suportando condições extremas de clima, relevo e solo, estando presente em todas as partes do mundo, embora tenha mais destaque nas regiões de clima semiárido (PIRES et al., 2015). Além disso, o conhecimento básico sobre os processos fisiológicos da espécie caprina pode ser estudado para obter estratégias no intuito de aumentar a eficiência reprodutiva em ruminantes domésticos tendo impacto na reprodução sustentada de espécies ameaçadas e animais valiosos, nos quais a morte da mãe e do feto é prematura ou repentina (KUMARI et al., 2017).

Com isso, biotecnologias reprodutivas eficientes são essenciais para sustentar a produção mundial (SOUZA-FABJAN et al., 2014). Neste sentido, a seleção e a reprodução da

espécie caprina são importantes, podendo ser aplicado nesta espécie os métodos convencionais como o acasalamento natural, inseminação artificial (IA) e produção *in vitro* de embrião (PIVE). Porém as melhorias genéticas resultantes desses métodos são geralmente lentas, levando o mercado a desenvolver outras biotécnicas que propagem mais rapidamente genes superiores, oferecendo assim esperança para modelar e projetar animais para atender às exigências do mercado nacional e mundial e do meio ambiente (HALDAR; GHOSH, 2015). Dentro dessa perspectiva, há uma necessidade da aplicação de técnicas de reprodução assistida com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva do rebanho, para que possa haver um aproveitamento mais eficiente dos melhores genótipos disponíveis.

A Inseminação Artificial, em caprinos, ainda enfrenta problemas de baixa eficiência, quando feita em tempo fixo, devido à baixa sincronização das ovulações, apresentando taxas de fertilidade entre 25 e 45% (PIRES et al., 2015). Outra biotécnica convencional bastante difundida é a Produção *In Vitro* e posterior transferência de embrião caprino. Nos últimos anos, os pesquisadores vêm tentando determinar quais condições são necessárias durante os processos de maturação e fertilização *in vitro* a fim de obter o desenvolvimento *in vitro* ideal para melhorar a produção de embriões otimizando a técnica (ASAD et al., 2018; FERREIRA-SILVA et al 2017; KUMAR et al., 2014; MALIK et al., 2015; SILVA et al., 2015), permitindo com isso também, o avanço de tecnologias reprodutivas como a clonagem e transgenia (BAI et al., 2017; FENG et al., 2015; SONG et al., 2016; THOMAS et al., 2016; YANG et al., 2016; ZHANG, et al., 2014).

Existem ainda, técnicas reprodutivas experimentais como os transplantes gonadais, que possibilitam a recuperação das atividades dos tecidos ovarianos e testiculares de humanos ou animais domésticos e silvestres que estejam até mesmo em risco de extinção. Algumas aplicações podem ser destacadas para esta técnica, em humanos, por exemplo, em casos de falência ovariana prematura (SILBER et al., 2008), retomada da produção hormonal e fertilidade (DONNEZ et al., 2011), e manutenção da fertilidade em mulheres portadoras de câncer (DONNEZ et al., 2004), como também, estudos sobre a resposta dos tecidos transplantados à administração de diferentes hormônios exógenos em função da idade, da condição fisiológica do (a) doador (a) e receptor (a) e estudo de contracepção (BEZERRA; MACEDO, 2013).

O transplante de tecido ovariano poderá resultar para a fêmea doadora a restauração da fertilidade, onde se observa a recuperação de folículos e oócitos após esse procedimento (GOSDEN et al., 1994a).. O xenotransplante, por sua vez, envolve o transplante de tecido de uma espécie para outra, e surge como um meio potencial para a obtenção de gametas viáveis

para procriação a partir de tecido ovariano congelado e como uma abordagem alternativa para estudar mecanismos de desenvolvimento folicular (OKTAY et al., 1998). Além disso, técnicas reprodutivas assistidas aplicadas a espécies selvagens, juntamente com a criopreservação de gametas e embriões, são recursos valiosos em empreendimentos conservacionistas. Dessa maneira, uma combinação de criopreservação e xenotransplante promete preservar o germoplasma e propagar um número crescente de espécies em risco de extinção (BOSCH et al., 2004).

## 1.2.2. Xenotransplante ovariano

### 1.2.2.1. Desenvolvimento folicular e neovascularização

O ovário é dividido em córtex e medula. Na medula estão presentes os nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. O córtex é formado por células do estroma, corpos lúteos e folículos em desenvolvimento, que por sua vez albergam os oócitos, gametas femininos responsáveis, parcialmente, pela produção de embriões. Para os mamíferos, os folículos ovarianos são classificados, em termos gerais, em pré-antrais e antrais. Os folículos pré-antrais são constituídos por folículos primordiais, primários e secundários e são diferenciados entre si pela forma e número de camadas de células da granulosa que circundam o oócito (FAIR, 2003; GONÇALVES et al., 2008). Por outro lado, os folículos antrais são aqueles que apresentam cavidade antral, ou seja, presença de líquido folicular (GONÇALVES et al., 2008; RODRIGUEZ; FARIN, 2004; VAN DEN HURK et al., 2000).

Os folículos se tornam responsivos aos hormônios gonadotróficos a partir do estágio secundário e então podem progredir para o estágio seguinte do desenvolvimento (antral) com uma circulação mínima de FSH, no entanto o hormônio luteinizante (LH) parece ser mais importante para o crescimento dos folículos neste estágio do desenvolvimento, provavelmente devido às células da granulosa apresentar receptores para FSH pouco funcionais. Assim, através dos receptores de LH nas células da teca, o hormônio desencadeia o processo de biossíntese de andrógenos tecais que podem estimular a formação de novos receptores de FSH nas células da granulosa. Deste modo, o FSH pode amplificar seu efeito sobre os folículos secundários (YOUNG; MCNEILLY, 2010).

A dinâmica folicular a nível macroscópico pode ser avaliada por ultrassonografia, podendo ser observado folículos antrais em ovário *in situ*, com ênfase especial no recrutamento, seleção e desvio folicular (AERTS; BOLS, 2009). Por outro lado, pesquisas

sobre dinâmica ou cinética de desenvolvimento folicular pré-antral, têm se concentrado cada vez mais em estudos microscópicos do desenvolvimento folicular precoce, em particular nos estádios primordiais e primários (BEZERRA et al., 1998; KUMARI et al., 2017).

Na maioria das espécies de animais domesticados, os ovários contêm um grande estoque de folículos primordiais não crescentes, que se desenvolvem durante a vida fetal e consistem em um oócito imaturo quiescente cercado por uma única camada de células (pré) granulosa achatadas. A transição gradual de folículos não crescentes para crescentes começa logo após a formação dos folículos primordiais e continua durante a vida reprodutiva (FORTUNE et al., 2003). Com isso, vários trabalhos foram realizados com intuito do estudo mais aprofundado sobre desenvolvimento folicular em diferentes espécies (BEZERRA et al., 1998; HENDRIKSEN et al., 2000; ROSSI et al., 2016; PANGAS et al., 2015). Estudos iniciais demonstraram que os folículos no tecido ovariano não são apenas capazes de sobreviver ao xenotransplante, mas também de crescer desde os estádios iniciais até os avançados (GOSDEN et al., 1994b; GUNASENA et al., 1998; OKTAY et al., 1998; WEISSMAN et al., 1999).

A reperfusão desempenha um papel importante na depleção dos folículos durante os primeiros dias até uma semana após o transplante (SOLEIMANI et al., 2011; YANG et al., 2006). Durante esta fase, o oxigênio e os nutrientes do tecido circundante difundem-se para o transplante, resgatando-o da isquemia e da hipóxia até a formação de novos vasos sanguíneos no interior tanto do transplante como do tecido circundante, até que o processo de revascularização esteja totalmente completo (VAN EYCK et al., 2009). No entanto, uma demanda dos folículos encontrados no xenotransplantes (cerca de 30%) aparentemente não consegue sobreviver às 48 h de hipóxia após o transplante antes da revascularização, sendo considerado um fator limitante a esta técnica. Porém, estudos mais recentes mostraram resultados promissores, já que mesmo após hipóxia, foi observado desenvolvimento do tecido ovariano bovino transplantado em duas linhagens de camundongos imunossuprimidos após administração de hormônios exógenos e 55 dias de transplante (PIMENTEL et al., 2017).

Ainda sobre desenvolvimento folicular, pesquisadores avaliaram a técnica de xenotransplante ovariano em camundongas imunossuprimidas por meio de ovariectomia unilateral total videolaparoscópica (OVL) em ovelhas, e verificaram viabilidade tecidual, com neovascularização e ausência de focos necróticos, porém sem visualização de folículos nas diferentes fases (BARROS et al., 2014).

Em contrapartida, Aerts et al. (2010) com intuito de desenvolver e testar uma nova abordagem para o xenotransplante de folículos pré-antrais isolados para a região subcapsular

renal de camundongas imunodeficientes, submeteram ovários de fetos bovinos e de bezerras à ação de enzimas para otimizar a obtenção de folículos e os filtraram imediatamente. Nesta técnica, os folículos suspensos foram isolados em solução salina tamponada com fosfato e as células da granulosa proveniente da digestão do ovário foram transplantadas nas fêmeas receptoras. A suspensão foi injetada sob a cápsula renal de camundongas Nude adultas. Quatorze dias após o xenotransplante, foi observada sobrevida folicular, proliferação do xenotransplante avaliada por histologia e expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) por imunomarcação, sendo realizada a comparação com o tecido controle. Com isso, foi observado que os folículos pré-antrais isolados foram capazes de sobreviver e crescer durante 14 dias após o xenotransplante sob a cápsula renal.

#### 1.2.2.2. Estimulo hormonal associado ao xenotransplante

Desde os primeiros estádios antrais até ovulação, o desenvolvimento folicular é dependente do FSH e LH (Hormônio folículo estimulante e hormônio luteinizante, respectivamente) secretado pela hipófise (MONNIAUX et al., 1997). Com o intuito de estimular o crescimento folicular mais rapidamente em transplantes, diferentes gonadotrofinas e doses têm sido usadas (GOOK et al., 2001; VAN DEN BROECKE et al., 2001; WEISSMAN et al., 1999); no entanto, os efeitos relatados são geralmente confundidos pela presença simultânea de gonadotrofinas endógenas produzidas pelas camundongas castradas comumente usadas como hospedeiras de xenotransplantes. Dessa maneira, não está claro em que medida as gonadotrofinas exógenas são necessárias para promover o desenvolvimento folicular no tecido ovariano xenotransplantado.

O crescimento folicular em tecido ovariano humano transplantado em camundongos hipogonadotróficos imunodeficientes não progrediu além do estágio da camada de 2 células (folículo secundário), mas folículos do estágio antral (terciário) foram observados após a administração de FSH exógeno (OKTAY et al., 1998). Estudos relataram o desenvolvimento de folículos antrais em tecidos do córtex ovariano transplantados em camundongos imunossuprimidos não estimulados (CANDY et al., 1995; GOSDEN et al., 1994b; GUNASENA et al., 1998; HERNANDEZ-FONSECA et al., 2001), sugerindo que as gonadotrofinas produzidas pelo hospedeiro podem promover o desenvolvimento folicular no tecido ovariano do doador sem o uso do estímulo hormonal.

Há trabalhos ainda, que demonstram resultados promissores quanto ao uso de estímulo hormonal após a realização do xenotransplante ovariano onde, Dos Santos et al. (2016)



avaliaram as respostas dos ovários de gatas à eCG quando transplantados em camundongas SCID fêmeas C57BL / 6, e observaram microscopicamente, folículos pré antrais e antrais todos com morfologia normal para a espécie estudada. Logo, o tratamento com eCG neste estudo foi eficaz para o desenvolvimento folicular, mas não promoveu uma boa resposta superovulatória.

Avaliando ainda o efeito da eCG no desenvolvimento de tecido ovariano felino xenotransplantado em camundongos imunossuprimidos aliado a neovascularização após o transplante, Macêdo et al. (2018) observaram que com o uso do eCG como forma de estímulo hormonal no xenotransplante de felinos, houve aumento significativo na densidade do volume vascular do tecido ovariano xenotransplantado, levando a crer que melhorou o desenvolvimento do tecido transplantado.

### 1.2.2.3. Associação de biotécnicas reprodutivas para fins de conservação

A criopreservação consiste na conservação de material biológico a baixas temperaturas, na maioria das vezes, a temperatura criobiológica do nitrogênio líquido (-196°C), possibilitando a célula ou tecido permanecerem viáveis por tempos indeterminados, podendo ser recuperados viáveis após processo de descongelação (BAKHACH, 2009) devido à redução do seu metabolismo, permanecendo em fase de anabiose.

A capacidade de criopreservar a estrutura e a função de células e tecidos exercem um controle central em várias áreas da biologia e da medicina. Em particular, a criopreservação de tecido ovariano em animais é uma estratégia promissora para programas conservacionistas e de melhoramento genético. Porém, independente do processo de criopreservação a ser empregado, é necessário que a viabilidade folicular possa ser efetivamente avaliada após a descongelação do fragmento conservado (MATOS et al., 2011). Com essa finalidade, a técnica de xenotransplante do tecido ovariano criopreservado para camundongos imunossuprimidos se apresenta como modelo para o estudo do desenvolvimento folicular (GOSDEN et al., 1994b; OKTAY et al., 1998) e dos efeitos da criopreservação sobre a viabilidade folicular (NEWTON et al., 1996). Com o passar dos anos, iniciou-se o uso de animais imunodeficientes para realização de novas biotécnicas visando obter folículos com oócitos de tamanho apropriado para maturação *in vitro* fazendo com que o xenotransplante ovariano se tornasse um dos caminhos possíveis na produção *in vitro* de embriões (BEZERRA, 2010).

E estudo com associação da criopreservação ao xenotransplante, foi avaliado o desenvolvimento de tecido ovariano de cutias, onde foi estudado o ovário da espécie doadora a fresco e vitrificado após xenotransplante em camundongos fêmeas C57Bl / 6 (SCID). Após 40 dias, os transplantes foram removidos e avaliados quanto à morfologia, proliferação celular e ocorrência de fragmentação do DNA. A atividade ovariana retornou em quatro dos cinco camundongos que receberam tecido ovariano fresco de cutias e em um dos seis camundongos que receberam tecido vitrificado. Após a remoção do xenotransplante, observou-se predomínio de folículos primordiais e primários em todos os xenotransplantes, todavia, foi observado que na vitrificação houve redução da proliferação celular, sendo necessário o aperfeiçoamento nos protocolos de vitrificação para tecido ovariano desta espécie (PRAXEDES et al., 2018).

Outra técnica utilizada em associação ao xenotransplante é a produção de blastocistos a partir de folículos primordiais. Neste sentido, pesquisadores procuraram estabelecer o suíno como modelo para produção de blastocistos que haviam sido transplantados em camundongas Nude e maturados *in vitro*, em combinação com a fusão de fragmentos citoplasmáticos. Cerca de 60 dias após a detecção da abertura vaginal, foi administrado FSH suíno nas camundongas durante 2 semanas para melhorar seu desenvolvimento folicular. Os oócitos foram maturados *in vitro* e submetidos à centrifugação para preparação dos fragmentos citoplasmáticos sem placa metafásica (citoplastos). Três citoplastos foram fundidos por eletroestimulação (para cada oócito recuperado de um folículo xenogênico) e posteriormente levados para MIV. Em seguida, estes oócitos foram fertilizados e cultivados *in vitro*. Após a fusão, houve aumento da taxa de blastocistos quando comparado aos oócitos convencionais não tratados, demonstrando assim a possibilidade da utilização de folículos primordiais em suínos, em combinação com o xenotransplante de tecido ovariano e também com a fusão dos oócitos com os citoplastos (KANEKO et al., 2013).

### 1.2.3. Receptores para o xenotransplante

Os camundongos são animais de fácil manuseio, pequeno porte (aproximadamente 10 vezes menores do que os ratos), com características geneticamente bem definidas, um ciclo reprodutivo rápido, curto período gestacional (em torno de 21 dias), além de crescimento rápido dos filhotes e baixo custo de manutenção (ANDERSEN et al., 2004). Assim, importantes linhas de pesquisa biológicas os adotaram como modelos experimentais e devido

a todas essas características, o sistema imune dessa espécie foi caracterizado de maneira mais extensiva do que qualquer outra espécie.

Almejando reduzir as chances de possíveis rejeições após o xenotransplante, manipulações genéticas foram realizadas por pesquisadores que produziram roedores imunodeficientes para serem usados como receptores, sendo exemplos às linhagens C57BL6 SCID e BALB/c Nude, podendo ser utilizado tanto receptores fêmeas (SENBON et al., 2004; SENBON et al., 2005) quanto machos (HERNANDEZ-FONSECA et al., 2004; HERNANDEZ-FONSECA et al., 2005) para a realização do xenotransplante ovariano.

#### 1.2.4. Considerações finais

Muitas são técnicas que podem ser utilizadas para conservação do gameta, mas suas associações é que determinam que o resultado final seja promissor. Sendo assim, o xenotransplante associado a criopreservação e a produção *in vitro* de embrião, são contempladas nas pesquisas, devido à importância e vantagens reprodutivas que a mesma engloba, com o intuito de auxiliar tanto na produção de animais de grande valor zootécnico que por algum motivo perderam sua função reprodutiva quanto na fauna silvestre que corre risco de extinção.

#### 1.2.5. Objetivos

##### 1.2.5.1. Objetivo geral

Avaliar o desenvolvimento e viabilidade do tecido ovariano caprino, na fase fetal e na fase pré-pubere, xenotransplantado a fresco ou após criopreservado em diferentes linhagens e sexo de camundongos imunossuprimidos.

##### 1.2.5.2. Objetivos específicos

- Examinar a microscopia dos tecidos doador e receptor;
- Analisar o efeito da criopreservação sobre o tecido xenotransplantado;
- Investigar a influência do xenotransplante na produção de 17 $\beta$ - estradiol;

- Avaliar a exequibilidade em conservar e desenvolver oócitos caprinos em dois modelos de camundongos machos imunodeficientes;

## REFERÊNCIAS

- AERTS, J. M. J. et al. Xenotransplantation by injection of a suspension of isolated preantral ovarian follicles and stroma cells under the kidney capsule of Nude mice. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 2, p. 708-714, 2010.
- AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 1, p. 171-179, 2010.
- ALMODIN, C. G. et al. Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. **Human reproduction**, v. 19, n. 6, p. 1287-1293, 2004.
- AMORIM, C. A. et al. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. **Fertility and sterility**, v. 79, p. 682-686, 2003.
- ANDERSEN, M. L.; D'ALMEIDA, V. K. O. G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; DE MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. 1 ed. São Paulo: UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo. p.122, 2004.
- ASAD, L. et al. Effect of Follicular Fluid on *in vitro* Maturation, Fertilization and Development of Goat Embryos using Fresh Semen. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**, v.6, n. 6, p. 349 – 354, 2018.
- BAI, D. P. et al. Generation of a transgenic cashmere goat using the piggyBac transposition system. **Theriogenology**, v. 93, p. 1-6, 2017.
- BAKHACH, J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. **Organogenesis**, v.5, n.3, p.119–126, 2009.
- BARROS, F. F. P. C. et al. Xenotransplante em camundongos imunossuprimidos coletado por meio de ovariectomia unilateral total vídeolaparoscópica em ovelha. **Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte**, v. 38, p. 121-126, 2014.
- BEZERRA, M. B. et al. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v. 8, n. 2, p. 47-56, 1998.
- BEZERRA, M. B. et al. Xenotransplantes ovarianos e testiculares: estado da arte e perspectivas em mamíferos domésticos e silvestres. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, p. 407-411, 2014.

BEZERRA, M. B.; MACEDO, M. F. Transplante Ovariano. In: OLIVEIRA, M. E. F.; VICENTE, W. R. R.; TEIXEIRA, P. P. M. **Biotecnias Reprodutivas em ovinos e caprinos**. 1ed. São Paulo: MedVet Livros, v. 1, p. 235-245, 2013.

BEZERRA, M. B. **Folículos ovarianos pré-antrais bovinos: cultivo in vitro e xenotransplante**. 2010. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2010.

CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Ovary and ovulation: Follicular development in cryopreserved marmoset ovarian tissue after transplantation. **Human Reproduction**, v. 10, n. 9, p. 2334-2338, 1995.

CANDY, C. J.; WOOD, M. J.; WHITTINGHAM, D. G. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. **Human Reproduction**, v. 15, n. 6, p. 1300-1304, 2000.

DE MACÊDO, L. B. et al. Equine chorionic gonadotrophin improved vascularization of feline ovarian tissue xenografted into immunosuppressed mice. **Theriogenology**, v. 121, p. 78-81, 2018.

DONFACK, N. J. et al. In vivo and in vitro strategies to support caprine preantral follicle development after ovarian tissue vitrification. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 8, p. 1055-1065, 2018.

DONNEZ, J. et al. Live birth after allografting of ovarian cortex between genetically non-identical sisters. **Human Reproduction**, v.26 n.6: p.1384-1388, 2011.

DONNEZ, J. et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. **The lancet**, v. 16, p. 1405-1410, 2004.

DOS SANTOS, F. A. et al. Follicular right shift: Xenografting queens' ovarian tissue into severe combined immunodeficiency mice and its responses to exogenous gonadotropin. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1811-1817, 2016.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Anim. Reprod., Sci.**, v. 78, n. 3/4, p. 203-216, 2003.

FAO, 2009. Domestic animal genetic diversity. Available from: <http://www.fao.org/biodiversity/geneticresources/bio-domesticanimals/en/>.

FENG, X. et al. Production of transgenic dairy goat expressing human  $\alpha$ -lactalbumin by somatic cell nuclear transfer. **Transgenic research**, v. 24, n. 1, p. 73-85, 2015.

FERREIRA-SILVA, J. C. et al. Full-term potential of goat in vitro produced embryos after different cryopreservation methods. **Cryobiology**, v. 75, p. 75-79, 2017.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3-4, p. 135-163, 2003.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Roca; 2008.

GOOK, D. A. et al. Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. **Human Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 417-422, 2001.

GOSDEN, R. G. et al. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. **Journal of reproduction and fertility**, v. 101, n. 3, p. 619-623, 1994b.

GOSDEN, R. G. et al. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196 C. **Human Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 597-603, 1994a.

GUNASENA, K. T. et al. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. **Animal reproduction science**, v. 53, n. 1-4, p. 265-275, 1998.

HALDAR, C.; GHOSH, S. Dynamics and regulation of goat reproduction. **International Journal of Current Research and Academic Review**, v. 3, n. 8, p. 20-36, 2015.

HENDRIKSEN, P. J. M. et al. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 11-20, 2000.

HERNANDEZ-FONSECA, H. J. et al. Time course of follicular development after bovine ovarian tissue transplantation in NOD SCID mice. **Fertility and Sterility**, v. 76, n. 3, p. S34-S35, 2001.

HERNANDEZ-FONSECA, H. J.; BOSCH, P.; MILLER, D. P.; WININGER, J. D.; MASSEY, J. B.; BRACKETT, B. G. Time course of follicular development after bovine ovarian tissue transplantation in male non-obese diabetic severe combined immunodeficient mice. **Fertility and Sterility**, v.83, n.1, p.1180-1187, 2005.

HERNANDEZ-FONSECA, H.; BOSCH, P.; SIRISATHIEN, S.; WININGER, J. D.; MASSEY, J. B.; BRACKETT, B. G. Effect of site of transplantation on follicular development of human ovarian tissue transplanted into intact or castrated immunodeficient mice. **Fertility and sterility**, v. 81, p. 888-892, 2004.

IUCN Species Survival Commission, 2016. IUCN Red List Categories and Criteria, Version 3. 1. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

KANEKO, H. et al. Improved developmental ability of porcine oocytes grown in Nude mice after fusion with cytoplasmic fragments prepared by centrifugation: A model for utilization of primordial oocytes. **Theriogenology**, v. 80, n. 8, p. 887-892, 2013.

KUMAR, D. et al. Developmental potency of pre-implant parthenogenetic goat embryos: effect of activation protocols and culture media. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 50, n. 1, p. 1-6, 2014.

KUMARI et al. Morphometric and Histological Characterization of Goat Fetal Ovaries. **Journal of Dairy and Veterinary Sciences**, v. 3 n. 1, p. 01-07, 2017.

MALIK, H. N. et al. Generation of parthenogenetic goat blastocysts: effects of different activation methods and culture media. **Zygote**, v. 23, n. 3, p. 327-335, 2015.

MATOS, M. C.; BEZERRA, M. B.; VICENTE, W. R. R. Criopreservação e xenotransplante de tecido ovariano. **Rev. bras. reprod. anim**, v. 35, n. 4, p. 467-471, 2011.

MATTISKE, D.; SHAW, G.; SHAW, J. M. Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. **Reproduction**, v. 123, n. 1, p. 143-153, 2002.

MCNATTY, K. P. et al. Control of early ovarian follicular development. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 54, p. 3-16, 1999.

METCALFE, S. S.; SHAW, J. M.; GUNN, I. M. Xenografting of canine ovarian tissue to ovariectomized severe combined immunodeficient (SCID) mice. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 57, p. 323-329, 2001.

MONNIAUX, D. et al. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 51, p. 3-23, 1997.

NEWTON H et al. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Hum Reprod**, v.11, p.1487-1491, 1996.

OKTAY, K. et al. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 13, n. 5, p. 1133-1138, 1998.

PANGAS, S. A.; RAJKOVIC, A. Follicular Development: Mouse, Sheep and Human Models. In: **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. Academic Press Waltham, MA, 2015. p. 947-995.

PARIS, M. C.; SNOW, M.; COX, S. L.; SHAW, J. M. Xenotransplantation: a tool for reproductive biology and animal conservation?. **Theriogenology**, v. 61, n. 2, p. 277-291, 2004.

PIMENTEL, M. M. L. et al. Biochemical, thermographic, and follicular responses of murine models of hormone-treated bovine ovarian renal capsule xenografts. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 425-431, 2017.

PIRES, J. E. P. et al. Utilização do enalapril em reprodução de caprinos: uma prospecção tecnológica. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 3, p. 2260-2272, 2015.

PRAXEDES, É. C. G. et al. Development of fresh and vitrified agouti ovarian tissue after xenografting to ovariectomised severe combined immunodeficiency (SCID) mice. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 3, p. 459-468, 2018.

RODRIGUEZ, K. F.; FARIN C. E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.16, n.1/2, p.55- 67, 2004.

- ROSSI, R. O. et al. Influence of BMP-2 on early follicular development and mRNA expression of oocyte specific genes in bovine preantral follicles cultured in vitro. **Histology and histopathology**, v. 31, n. 3, p. 339-348, 2016.
- RUPP, R. et al. Genomic application in sheep and goat breeding. **Animal Frontiers**, v. 6, n. 1, p. 39-44, 2016.
- SANTOS, R. R. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal reproduction science**, v. 122, n. 3-4, p. 151-163, 2010.
- SENBON, S. et al. Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. **Zygote**, v. 11, n. 2, p. 139-149, 2003.
- SENBON, S.; ATSUSHI, O.; TACHIBANA, M.; MYIANO, T. Xenotransplantation of Bovine Secondary Follicles into Male and Female SCID Mice. **Journal of Mammalian Ova Research**, v.21, p.157-161, 2004.
- SENBON, Shoichiro et al. Fertilization and development of bovine oocytes grown in female SCID mice. **Zygote**, v. 13, n. 4, p. 309-315, 2005.
- SILVA, G. M. et al. *In vitro* development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. **Zygote**, v. 23, n. 4, p. 475-484, 2015.
- SNOW, M. et al. Live young from xenografted ovarian tissue. In: **biology of reproduction**. USA: Soc Study Reproduction, 2002. p. 197-197.
- SOLEIMANI, R.; HEYTENS, E.; OKTAY, K. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e19475, 2011.
- SONG, H. et al. Big animal cloning using transgenic induced pluripotent stem cells: a case study of goat transgenic induced pluripotent stem cells. **Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")**, v. 18, n. 1, p. 37-47, 2016.
- SOUZA-FABJAN, J. G. et al. In vitro embryo production in goats: Slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up–derived oocytes have different kinetics and requirements regarding maturation media. **Theriogenology**, v. 81, n. 8, p. 1021-1031, 2014.
- TAHAEI, L. S. et al. Follicle development of xenotransplanted sheep ovarian tissue into male and female immunodeficient rats. **International journal of fertility & sterility**, v. 9, n. 3, p. 354, 2015.
- THOMAS, N. et al. Molecular cloning, SNP detection and association analysis of 5' flanking region of the goat IGF1 gene with prolificacy. **Animal reproduction science**, v. 167, p. 8-15, 2016.



VAN DEN BROECKE, R. et al. Follicular growth in fresh and cryopreserved human ovarian cortical grafts transplanted to immunodeficient mice. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 97, n. 2, p. 193-201, 2001.

VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERS, M. M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Hum. Reprod. Update.**, v.6, n.5, p.457-74, 2000.

VAN EYCK, A.; JORDAN, B. F.; GALLEZ, B.; HEILIER, J. F.; VAN LANGENDONCKT, A.; DONNEZ, J. Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 1, p. 374-381, 2009.

WANG, X. et al. Cryopreservation: fertility after intact ovary transplantation. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 385, 2002.

WEISSMAN, A. et al. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 6, p. 1462-1467, 1999.

WIEDEMANN, C. et al. Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 300-304, 2012.

WILDT, D. E. Genome resource banking for wildlife research, management, and conservation. **ILAR journal**, v. 41, n. 4, p. 228-234, 2000.

WOLVEKAMP, M. C. J. et al. Follicular development in cryopreserved common wombat ovarian tissue xenografted to Nude rats. **Animal reproduction science**, v. 65, n. 1-2, p. 135-147, 2001.

YANG, H. Y.; COX, S. L.; JENKIN, G.; FINDLAY, J.; TROUNSON, A.; SHAW, J. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. **Reproduction**, v. 131, p. 851-859, 2006.

YANG, M. et al. Oocytes from small and large follicles exhibit similar development competence following goat cloning despite their differences in meiotic and cytoplasmic maturation. **Theriogenology**, v. 86, n. 9, p. 2302-2311, 2016.

YOUNG, J. M.; MCNEILLY, A. S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, v.140, p.489-504. 2010.

ZHANG, Q. et al. Production GH transgenic goat improving mammogenesis by somatic cell nuclear transfer. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 7, p. 4759-4768, 2014.

## 2. CAPÍTULO 2 – ATIVAÇÃO FOLICULAR EM FRAGMENTOS DE OVÁRIO DE FETO CAPRINO TRANSPLANTADOS EM DUAS LINHAGENS

### 2.1. Resumo

**RESUMO** – O objetivo deste estudo foi avaliar o aproveitamento de tecido ovariano fetal caprino xenotransplantado a fresco ou após criopreservado em duas linhagens de camundongos imunossuprimidos (C57BL/6 SCID e BALB/c Nude). Ovários de fetos caprinos foram colhidos após o abate de suas genitoras, divididos em pequenos fragmentos que foram destinados a avaliação controle, ao xenotransplante a fresco (XF) e xenotransplante após criopreservação (XC). Foram utilizadas cinco receptoras de cada linhagem para o xenotransplante a fresco e 10 animais de cada linhagem para o xenotransplante criopreservado. As camundongas receptoras foram eutanasiadas após 65 dias de pós-operatório, sendo coletados os transplantes para avaliação macro e microscópicas e o sangue coletado por via intracardíaca para mensuração de  $17\beta$ - estradiol. Independente das linhagens, todas as receptoras apresentaram taxa de retorno a atividade ovariana com ciclo estral completo após XF e 80% após XC. Foram observados folículos em todas as fases de desenvolvimento e sem alterações morfológicas. A densidade de volume e a superfície total de vasos observados nos transplantes foram diferentes ( $p < 0,01$ ) entre os grupos XF e XC. A dosagem de  $17\beta$ - estradiol nas receptoras não diferiu ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos. Concluiu-se que é possível ativar os folículos pré-antrais dos ovários de fetos otimizando o aproveitamento e conservação do germoplasma de caprinos desde que obedecidos os tempos e condições para o xenotransplante independente da linhagem receptora.

Palavras-chave: criopreservação, foliculogênese, tecnologia reprodutiva assistida, pecuária, reprodução

## 2.2. Introdução

O cultivo de folículos pré-antrais vem sendo estudado experimentalmente tanto *in vitro* (LEAL et al, 2018; MAGALHÃES et al., 2011; SARAIVA et al., 2010) e *in vivo* com o autotransplante (DONFACK et al., 2018; SANTOS et al., 2009). A espécie caprina pode ser utilizada como modelo experimental para humanos, visando estudos na área de endocrinologia e determinação da função ovariana, dada a semelhança fisiológica que ocorre nestes processos (LIU et al., 2007).

Em outro contexto, a incidência de pequenos ruminantes silvestres, de raças autoctones ou importados para fins comerciais, que sofrem situações de predação é um fato recorrente na natureza e em criações de pequeno porte. Especificamente sobre caprinos domésticos e silvestres este tem se constituído presas fáceis para carnívoros domésticos e silvestres (DURAWO et al., 2017; KHAN et al., 2018; ROSHNATH et al., 2017). Uma vez que filhotes e fêmeas gestantes apresentam menor mobilidade e são mais facilmente abatidas (DURAWO et al., 2017), a perda de material genético nessas condições de vulnerabilidade pode se tornar inestimável.

Baseados no contexto acima descrito, pesquisas tem sido realizada na área de reprodução animal visando aumentar o potencial reprodutivo de animais de alto valor zootécnico (COMMIN et al., 2012) ou preservação de mamíferos em vias de extinção como por exemplo em cervídeos (COMIZZOLI; WILDT, 2014; COMIZZOLI, 2015). O xenotransplante de tecido ovariano apresenta-se como técnica potencial para a manutenção e desenvolvimento de material genético, principalmente quando combinada com métodos de preservação de gamoplasma como a vitrificação, que permite assim um melhor planejamento e preparo de equipes envolvidas bem como na melhor destinação do tecido a ser transplantado. Ademais, a combinação da criopreservação de tecido ovariano com xenotransplante em receptores imunodeficientes têm demonstrado relevante importância científica à medida que vem demonstrando desenvolvimento folicular considerável (AERTS et al., 2010; PRAXEDES et al., 2018; SANTOS et al., 2010; WIEDEMANN et al., 2012).

A utilização de camundongos imunodeficientes como receptores de transplantes ovarianos tem sido um requisito indispensável para o desenvolvimento de tecidos transplantados. Em estudo prévio comparando as duas condições de imunodeficiência (C57BL/6 SCID e BALB/c Nude) no desenvolvimento de folículos ovarianos bovinos xenotransplantados, foi observada uma melhor resposta da técnica com animais da linhagem C57BL/6 SCID (PIMENTEL et al., 2017). Considerando as informações acima descritas,

objetivou-se nesta pesquisa, avaliar o desenvolvimento e viabilidade do tecido ovariano fetal caprino após a realização do xenotransplante a fresco ou após criopreservação em duas linhagem de camundongas imunossuprimidas.

### 2.3. Material e Métodos

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações do Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (1988), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição sob o número de protocolo 23091006934/2015-73.

#### 2.3.1. Doadoras dos ovários

Foram colhidos seis pares de ovários de fetos caprinos com idade gestacional que variou de 120 a 140 dias, sem raça definida, oriundos de abatedouros locais. Os ovários dos fetos foram lavados com solução salina a 0,9%, em seguida, transportados em tubos estéreis (50 mL), identificados contendo solução salina a 0,9% com 100 µg/mL de penicilina a temperatura ambiente.

O tecido ovariano foi dividido em pequenos fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> os quais foram então separados em três grupos: controle (para análise histológica), transplantados a fresco (XF): sendo eles inseridos sem reanastomose vascular sob a cápsula renal do rim esquerdo das fêmeas receptoras (cinco fragmentos por receptor) ou criopreservado (XC) e também transplantados após 15 dias de criopreservação. Os fragmentos transplantados a fresco foram mantidos em Meio Essencial Mínimo (MEM) até o momento do transplante, não se excedendo o limite de cinco horas desde a colheita até o transplante.

#### 2.3.2. Criopreservação dos fragmentos corticais

Nessa etapa foi utilizado o *pool* de fragmentos destinado ao grupo criopreservado. A solução de vitrificação (VS) foi constituída por 3 mols / L de dimetilsulfóxido (DMSO) em Meio Essencial Mínimo (MEM), suplementado com 0,5M de sacarose (SUC) e 10% de soro fetal bovino (SFB).

Todos os fragmentos do ovário foram expostos a 1,8 mL de VS durante 5 minutos e o excesso da solução foi retirado com gaze estéril e, então postos sobre lâminas de papel alumínio parcialmente imerso em nitrogênio líquido (LN2), sendo vitrificado. Depois disso, a

amostra foi transferida (com pinça refrigerada com nitrogênio) para criotubos para armazenamento em LN2 (-196 °C).

Após 15 dias as amostras foram submetidas à temperatura ambiente (aproximadamente 25 ° C) durante 1 min e depois imersas em banho maria a 37 °C durante 5 s. O DMSO foi removido do fragmento ovariano por três lavagens consecutivas durante 5 min em MEM suplementado com 10% de SFB e diminuição das concentrações de sacarose (0,50; 0,25 e 0 mol / L). Em seguida, os fragmentos de ovários foram xenotransplantados nas receptoras.

### 2.3.3. Receptoras

Foram utilizadas camundongas imunodeficientes da linhagem C57BL/6 SCID (n = 15) e da linhagem BALB/c Nude (n = 15) todas entre 20 e 24 semanas de idade, alojadas em caixas estéreis e sob um ciclo de luz/escuridão de 12 horas a 22 °C e alimentadas *ad libitum*.

Para o delineamento experimental foram utilizados 5 animais de cada linhagem para a realização do xenotransplante a fresco e 10 animais de cada linhagem para o xenotransplante criopreservado.

### 2.3.4. Xenotransplante

As receptoras foram anestesiadas com 2,2,2-tribromoetanol a 2,5%, na dose de 18 ml/kg (SCID) e 20 ml/kg (NUDE) de peso, administrado por via intraperitoneal. As dosagens foram assim estabelecidas a partir de experimentos prévios (dados não publicados).

Após a ovariectomia bilateral das receptoras, cinco fragmentos do *pool* de tecido ovariano caprino foram delicadamente inseridos sob a cápsula renal esquerda das receptoras após o qual foi verificada a ocorrência de quaisquer anormalidades e na ausência dessas, os tecidos foram devolvidos à posição anatômica e a cavidade abdominal fechada. Ao final do procedimento, os animais foram acondicionados em mini-isoladores aquecidos a 37° C até a completa recuperação anestésica.

### 2.3.5. Lavado vaginal

Transcorridos cinco dias do procedimento cirúrgico, foi realizado lavado vaginal nas fêmeas transplantadas para avaliação do ciclo estral a cada 12 horas, durante 60 dias. Para

tanto, os animais foram devidamente contidos e o lavado realizado com o auxílio de uma micropipeta de 20 µl preenchida com solução salina a 0,9%. Os lavados foram avaliados sob microscopia de luz invertida e sem coloração, em aumento de 20x. A classificação da fase do ciclo estral por meio de lavado vaginal foi baseada nos critérios estabelecidos previamente (BYERS et al., 2012; COOPER et al., 1993).

#### 2.3.6. Dosagem hormonal

Após 65 dias de transplantes, os animais foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol por via intraperitoneal. Após a anestesia geral, cuja profundidade foi avaliada pela ausência do reflexo podal, foi realizada a punção cardíaca de acordo com Hoff (2000). O volume total de sangue coletado nos animais foi de aproximadamente 1mL. Após este procedimento os animais foram eutanasiados. A verificação do óbito dos animais foi realizada pela ausência de sinais vitais como batimentos cardíacos e movimentos respiratórios. O sangue de cada animal foi centrifugado à 2000g por 10 minutos a temperatura ambiente para obtenção do plasma. As amostras foram então analisadas em duplicata para determinação das concentrações de 17β-estradiol usando quimioluminescência amplificada utilizando um sistema de imunoensaio (Vitros Eci / EciQ Immunodiagnostic System, Johnson e Johnson) de acordo com as instruções do fabricante e seguindo os métodos de (BARTOSKOVA et al., 2014).

#### 2.3.7. Processamento histológico e avaliação

Dos transplantes recuperados, os folículos antrais de maior tamanho foram aspirados durante a retirada e o restante foi imediatamente imersos em solução de paraformaldeído à 4% tamponados com solução fosfato (pH 7,2) durante 24 horas e posteriormente desidratados, diafanizados e incluídos em parafina e seccionados de forma semi-seriada à espessura de 5 µm, sendo montado uma secção a cada 60 µm. Posteriormente foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM).

O tecido ovariano foi avaliado quanto à integridade do seu parênquima, qualidade e classificação dos folículos ovarianos em pré-antrais (categorias) e antrais, bem como vascularização e agregação das células do estroma. Os folículos foram analisados quanto ao tipo e o número de camadas de células da granulosa que circundam o oócito e foram classificados em primordial, primário, secundário e antral de acordo com Kumari et al. (2017).

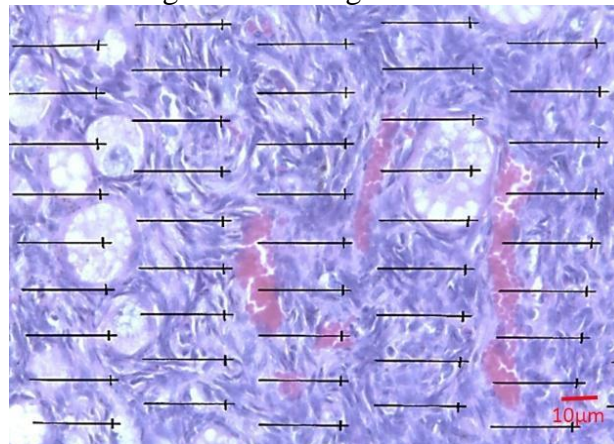
### 2.3.8. Análise estereológica da vascularização

De cada secção do xenotransplante foi capturada, de forma aleatória, uma imagem na objetiva de 10X, totalizando 10-12 fotomicrografias. As quais foram sobrepostas por um sistema teste utilizado para mensuração do volume de cada fragmento pelo princípio de Cavalieri conforme descrito por Macêdo et al. (2018).

O volume do fragmento do ovário xenotransplantado foi determinado usando a seguinte fórmula: *Volume do fragmento* =  $\Sigma p \times a(p) \times T$ , onde  $\Sigma p$  é o somatório que sobrepõem a imagem,  $a(p)$  é área associada a cada ponto e T é a distância entre cada secção da amostra.

Das mesmas secções foram fotografados cinco campos aleatoriamente na objetiva de 40X utilizando microscópio com câmera acoplada (LEICA DM500) para determinação da densidade de volume e de área de vasos sanguíneos. Para quantificação, um sistema teste foi sobreposto as imagens (Figura 1).

Figura 1 – Fragmento ovariano de feto de cabra xenotransplantado na região subcapsular renal de camundongas com sobreposição do grid utilizado para determinação da densidade da superfície de volume dos vasos sanguíneos do fragmento.



Barra de escala = 10 $\mu$ m. Coloração HE.

A densidade de volume ( $V_v$ ) dos vasos nos fragmentos dos dois grupos foi calculada pela seguinte fórmula:  $V_v = (\Sigma p(\text{Vasos})) / (\Sigma p(\text{total}))$ , onde  $\Sigma p(\text{Vasos})$  é o somatório de pontos que tocam os vasos sanguíneos e  $\Sigma p(\text{total})$  é o total de pontos do sistema teste. A densidade de área ( $S_v$ ) foi mensurada pela fórmula:  $S_v = 2I / (\Sigma p \times I(p))$ , I corresponde ao número de interseções da reta nos vasos,  $i(p)$  é comprimento da reta e  $\Sigma p$  é somatório dos pontos que tocam o tecido ovariano xenotransplantado. A superfície total de vasos ( $\mu\text{m}^2$ ) foi determinada multiplicando a  $S_v$  pelo volume do fragmento do xenotransplante.

### 2.3.9. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos previamente à estatística descritiva. Para os dados obtidos nas análises das proporções foliculares foi aplicado o Teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

Para a comparação de médias dos dados de contagens (valores absolutos) entre os tratamentos os dados foram submetidos, previamente, à análise de pressupostos (Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, Levene, Lilliefors), após a constatação da heterocedasticidade e da distribuição não-Gaussiana, foi procedida a análise das amostras pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste *post hoc* Dunn. O pacote computacional utilizado foi o software STATISTICA® 8.

As médias da duração das fases do ciclo estral e dosagem hormonal foram comparadas por ANOVA seguido do teste de Tukey. Os dados de desenvolvimento do tecido transplantado foram trabalhados por meio de porcentagem. Sendo utilizado para tal finalidade o BioEstat 5.0 e o Microsoft Office Excel 14.0.

Os dados da esterilogia foram analisados através do teste Mann-Whitney, usando o programa Graph Prism versão 3.05.

Todas as comparações foram realizadas em função dos grupos experimentais com nível de probabilidade de 5%.

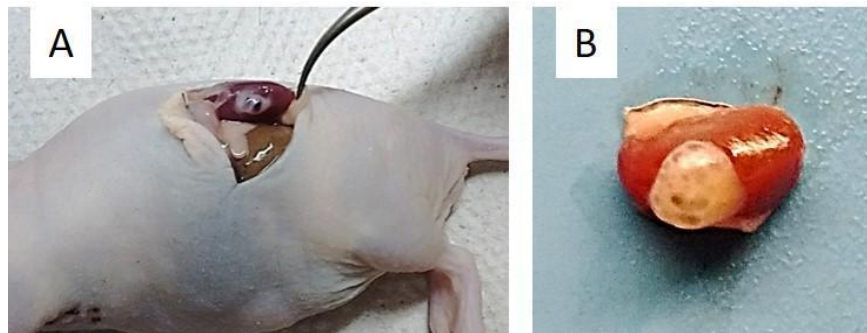
## 2.4. Resultados

### 2.4.1. Achados macroscópicos

No momento da colheita dos transplantes foi observado o desenvolvimento do tecido transplantado com coloração normal bem como vários folículos antrais na sua superfície. Esta observação foi confirmada pela avaliação histológica, constatando assim que houve 100% (n = 05/05) de desenvolvimento do tecido transplantado a fresco e 80% (n = 8/10) após criopreservação nas fêmeas de ambas as linhagens: C57BL6 SCID e BALB/c Nude (Figura 2).



Figura 2 – Fragmento de córtex ovariano de feto de cabra coletado após 65 dias da realização do xenotransplante em receptoras imunossuprimidas (A), demonstrando o desenvolvimento ovariano sob a cápsula renal (B).

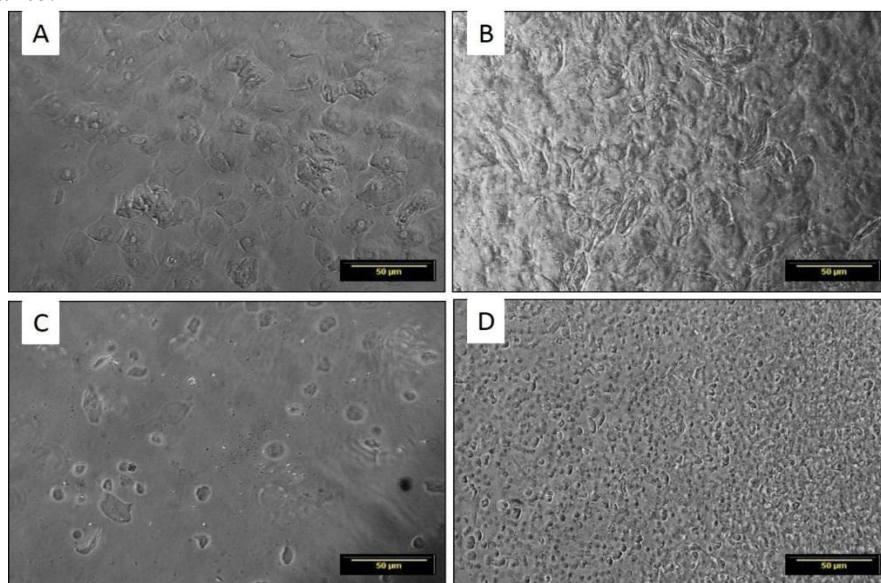


## 2.4.2. Achados microscópicos

### 2.4.2.1. Avaliação do lavado vaginal

Independente das linhagens, todas as receptoras apresentaram taxa de retorno a atividade ovariana com ciclo estral completo após transplante a fresco e 80% (n = 8/10) após criopreservação. Em todos os animais experimentais foram observadas as 4 fases do ciclo estral (Figura 3), porém, nos animais transplantados algumas fases foram mais prolongadas (Tabela 1,  $p < 0,05$ ).

Figura 3 – Padrão citológico do lavado vaginal de camundongas imunossuprimidas após xenotransplante.



A: proestro – presença de células epiteliais arredondadas e nucleadas (basais e parabasais); B: estro – células queratinizadas em maior proporção; C: metaestro – redução na quantidade de células queratinizadas, algumas células leucocitárias e surgimento de algumas células

epiteliais; D: diestro – pequena proporção de células epiteliais e queratinizadas e grande quantidade de células leucocitárias. Barra de escala: 50  $\mu$ m. Aumento de 20x.

Tabela 1 – Média e desvio padrão (horas) da duração das fases do primeiro ciclo estral dos diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais		Fases do ciclo estral			
		Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
C57BL6 SCID	Controle	12,0 $\pm$ 0,7 <sup>ab</sup>	96,0 $\pm$ 1,9 <sup>aA</sup>	12,0 $\pm$ 0,0 <sup>aB</sup>	48,0 $\pm$ 1,2 <sup>bB</sup>
	Fresco	24,0 $\pm$ 1,0 <sup>ab</sup>	32,0 $\pm$ 0,0 <sup>bA</sup>	12,0 $\pm$ 0,0 <sup>aA</sup>	160,0 $\pm$ 12,3 <sup>aA</sup>
	Crio	36,0 $\pm$ 1,7 <sup>aA</sup>	68,0 $\pm$ 12,5 <sup>aA</sup>	12,0 $\pm$ 0,0 <sup>aA</sup>	172,0 $\pm$ 2,5 <sup>aA</sup>
BALB/c Nude	Controle	72,0 $\pm$ 0,9 <sup>aA</sup>	48,0 $\pm$ 0,9 <sup>bB</sup>	24,0 $\pm$ 0,8 <sup>aA</sup>	72,0 $\pm$ 1,1 <sup>bA</sup>
	Fresco	40,0 $\pm$ 1,5 <sup>bA</sup>	36,0 $\pm$ 0,0 <sup>bA</sup>	12,0 $\pm$ 0,0 <sup>bA</sup>	120,0 $\pm$ 3,0 <sup>ab</sup>
	Crio	25,0 $\pm$ 1,1 <sup>bA</sup>	60,0 $\pm$ 4,2 <sup>aA</sup>	12,0 $\pm$ 0,0 <sup>bA</sup>	111,0 $\pm$ 4,3 <sup>ab</sup>

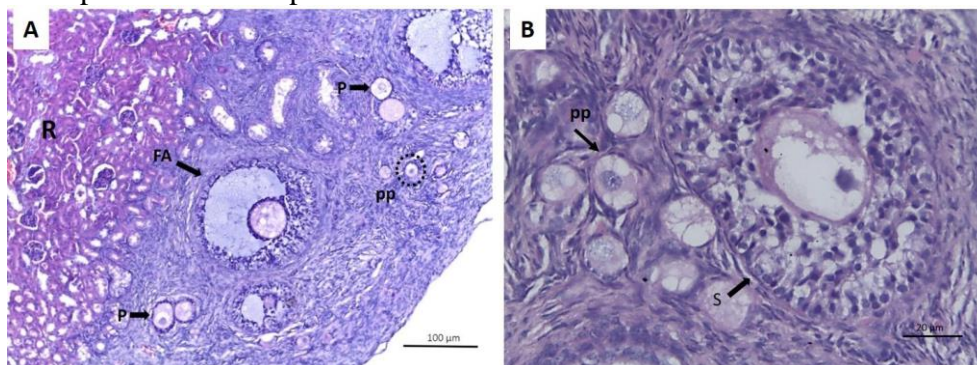
Letras minúsculas indicam comparação entre os tratamentos dentro da mesma linhagem. Letras maiúsculas indicam comparação entre o mesmo tratamento entre linhagens transplantadas diferentes.

O início desta atividade após o xenotransplante foi em média de 13  $\pm$  6 dias do transplante a fresco e 17  $\pm$  9 dias do transplante criopreservado nas fêmeas C57BL6 SCID e em 4  $\pm$  2 dias do transplante a fresco e 10  $\pm$  5 dias do transplante criopreservado nas fêmeas BALB/c Nude, observando-se irregularidade no ciclo estral de animais transplantados.

#### 2.4.2.2. Morfologia dos folículos pré-antrais e antrais

Foram observados folículos em todas as fases de desenvolvimento (Figura 4), logo, ambas as linhagens e o sítio receptor escolhido permitiram o desenvolvimento folicular até a fase antral após o transplante tanto a fresco como após criopreservação. Já os folículos atresícos, quando observados, apresentaram degeneração dos oócitos acompanhada por rompimento de camadas de células da granulosa e núcleos picnóticos das mesmas.

Figura 4 – Fotomicrografia de ovário de feto de cabra após o xenotransplante ovariano a fresco em receptoras imunossuprimidas.



A: folículos primordiais (pp), folículo antral (FA), folículo primário (P), região renal do receptor (R). Aumento de 10x. B: folículo secundário (S), folículo primordial (pp), região renal do receptor (R). Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento de 40x.

### 2.4.2.3. Proporção folicular

Foi observado desenvolvimento folicular completo após a realização do xenotransplante ovariano a fresco e criopreservado em ambas as linhagens. Quando comparado ao controle, observou-se uma diminuição dos folículos pré-antrais e um aumento no número de folículos antrais de ambas as linhagens e tratamentos. Foi observado ainda uma diminuição significativa na quantidade de folículos antrais da linhagem C56BL6 SCID quando comparado os tratamentos. Já na linhagem BALB/c Nude, após a criopreservação, obteve-se uma maior quantidade de folículos antrais em comparação do controle (Tabela 2,  $p < 0,05$ ).

Tabela 2 – Proporção folicular (%) do xenotransplante de ovário de feto caprino sob a cápsula renal de camundongas da linhagem C56BL6 SCID e BALB/c Nude.

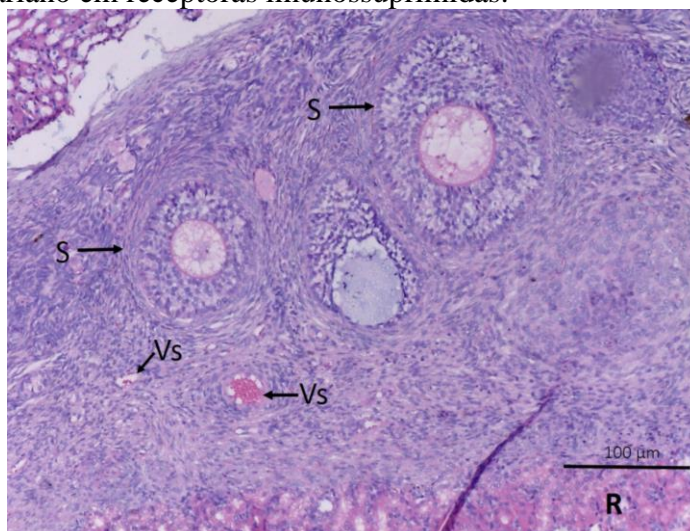
Tratamentos		Total de folículos	CATEGORIA FOLICULAR (%)				
			Primordial	Primário	Secundário	Antral Inicial	Antral
Controle	GC	n = 1288	88,3 ± 2,4 <sup>a</sup>	11,7 ± 2,4 <sup>b</sup>	0 ± 0,0 <sup>b</sup>	0 ± 0,0 <sup>c</sup>	0 ± 0,0 <sup>c</sup>
	SCID	n = 2757	47,7 ± 5,3 <sup>bA</sup>	27,6 ± 6,4 <sup>bA</sup>	13,3 ± 4,7% <sup>aA</sup>	7,1 ± 1,9 <sup>aA</sup>	4,2 ± 0,5 <sup>aA</sup>
Fresco	NUDE	n = 2599	46,6 ± 7,1 <sup>bA</sup>	30,5 ± 5,3 <sup>aA</sup>	16,7 ± 3,4 <sup>aA</sup>	3,7 ± 0,8 <sup>bA</sup>	2,4 ± 0,7 <sup>bB</sup>
	SCID	n = 200	46,6 ± 10 <sup>bA</sup>	25,1 ± 5% <sup>bA</sup>	22,9 ± 7 <sup>aA</sup>	3,8 ± 4,0 <sup>bA</sup>	1,5 ± 3,0 <sup>bB</sup>
Crio	SCID	n = 200	46,6 ± 10 <sup>bA</sup>	25,1 ± 5% <sup>bA</sup>	22,9 ± 7 <sup>aA</sup>	3,8 ± 4,0 <sup>bA</sup>	1,5 ± 3,0 <sup>bB</sup>
	NUDE	n = 90	38,7 ± 33 <sup>bA</sup>	39,5 ± 26 <sup>aA</sup>	12,4 ± 10 <sup>aA</sup>	4,4 ± 6,0 <sup>abA</sup>	5,1 ± 8,0 <sup>aA</sup>

Letras minúsculas comparam o grupo controle com cada tratamento. Letras maiúsculas comparam os tratamentos entre as linhagens (ex. SCID fresco x SCID crio).

### 2.4.2.4. Suprimento vascular para o tecido transplantado

Após 65 dias do xenotransplante, o fornecimento vascular oferecido pelo rim das receptoras aos fragmentos do córtex ovariano das doadoras foi considerado morfológicamente semelhante àquele existente no ovário *in situ* das doadoras, ocorrendo a neovascularização em 100% dos transplantes a fresco e 80% dos transplantes criopreservados de ambas as linhagens das receptoras (C57BL6 SCID e BALB/c Nude), sendo essas proporções as mesmas encontradas no retorno da atividade ovariana desses animais. Observou-se histologicamente vasos sanguíneos nos transplantes recuperados (Figura 5).

Figura 5 – Fotomicrografia de ovário de feto de cabra avaliando a vascularização após o xenotransplante ovariano em receptoras imunossuprimidas.



Folículos secundários (S), Vasos sanguíneos (Vs). Notar a integração do tecido cortical do ovário e o parênquima renal do receptor operado (R), HE. Aumento de 40x.

#### 2.4.2.5. Estudo estereológico dos vasos sanguíneos

Após análise dos dados obtidos pela contagem de todos os pontos e interseções do sistema teste, encontrou-se que o volume dos fragmentos, a densidade de volume e a densidade da superfície apresentaram diferença ( $p < 0,01$ ) entre os tratamentos da linhagem BALB/c Nude, conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Efeito da vitrificação sobre o volume do xenotransplante ovariano, densidade de volume (Vv), de área dos vasos (Sv).

Linhagem	Tratamentos	Volume (mm <sup>3</sup> )	Vv (%)	Sv (μm <sup>-1</sup> )
C57BL6 SCID	XF	34825,7 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	36,18 <sup>a</sup>
	XC	13038,7 <sup>a</sup>	5,71 <sup>a</sup>	5,93 <sup>a</sup>
BALB/c Nude	XF	35692,2 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	68,39 <sup>a</sup>
	XC	7839,98 <sup>b</sup>	3,33 <sup>b</sup>	3,46 <sup>b</sup>

Letras minúsculas comparam tratamentos da mesma linhagem. XF; Xenotransplante a fresco; XC: Xenotransplante após criopreservação.

#### 2.4.2.6. Dosagem hormonal

Foi realizada a concentração sérica de 17β- estradiol das camundongas receptoras ao final do experimento. Nas receptoras C57BL6 SCID no tratamento fresco a dosagem variou de 37,59 a 56,40 pg/mL, já nas do tratamento criopreservado variou de 35,26 a 56,60 pg/mL. Nas fêmeas BALB/c Nude do tratamento fresco esses valores variaram de 34,98 a 50,21 pg/mL e nas do tratamento criopreservado de 40,60 a 51,23 pg/mL (Tabela 4,  $p > 0,05$ ).

Tabela 4 – Concentração sérica de  $17\beta$ - estradiol após xenotransplante de ovário de feto caprino sob a cápsula renal de camundongas C56BL6 SCID e BALB/c Nude.

Linagem	Grupos	Estradiol (pg/mL)
C57BL6 SCID	Controle	53,4 ± 6,15
	XF	48,04 ± 8,00
	XC	42,48 ± 5,93
BALB/c Nude	Controle	51,57 ± 7,47
	XF	47,07 ± 8,37
	XC	45,23 ± 4,06

ns: não houve diferenças entre as comparações realizadas ( $p > 0,05$ ).

## 2.5. Discussão

O presente estudo fornece informações relevantes para o resgate de folículos pré-antrais em ovários de fetos caprinos após o xenotransplante. O aproveitamento de germoplasma animal é crescente da parte de pesquisadores e laboratórios com interesse em aproveitar animais economicamente e ecologicamente valiosos.

O retorno da atividade ovariana nas receptoras e a presença de um alto número de folículos primordiais bem como de antrais após o xenotransplante corroborou com a hipótese de que esta biotécnica representa uma ferramenta promissora para recuperação da função ovariana e para elucidar os mecanismos de neovascularização em tecidos frescos ou criopreservados (YOUM et al., 2014). No entanto, a preservação da fertilidade usando transplantes de tecidos ovarianos ainda está em fase experimental (LEE et al., 2015) e está sendo adaptada lentamente não apenas para animais, mas também para humanos (AYUANDARI et al., 2016).

Macroscopicamente foram observadas a adesão tecidual e a presença de vascularização em todos os tratamentos, que comprovam a eficácia do crescimento e neovascularização no período de permanência dos transplantes. A reperfusão desempenhou um papel importante para evitar a depleção dos folículos durante os primeiros dias até uma semana após o transplante (SOLEIMANI et al., 2011). Durante esta fase, ocorre isquemia e hipóxia até a formação de novos vasos sanguíneos no interior tanto do transplante como do tecido circundante (VAN EYCK et al., 2010), assim, com a neovascularização completa, o oxigênio e os nutrientes do tecido circundante difundiram para o tecido transplantado, restaurando-o.

A eficiência dessa reperfusão sanguínea teve um reflexo na observação de estro nas receptoras. A determinação do ciclo estral é de suma importância em procedimentos de

xenotransplante, pois servem como indicativos indiretos das alterações hormonais decorrentes da readaptação dos tecidos transplantados e que refletem no ciclo. Nesta pesquisa foram observadas irregularidades no ciclo estral dos animais após xenotransplante em ambos os tratamentos quando comparados ao controle, havendo fases mais prolongadas (no estro e diestro das receptoras BALB/c Nude e no estro das C57BL6 SCID) e outras fases mais curtas (no proestro e metaestro das BALB/c Nude e no diestro das C57BL6 SCID). Acredita-se que o estado fisiológico das receptoras possa influenciar o transplante e/ou sobrevivência folicular. Em alguns estudos de transplante ovariano, fêmeas ovariectomizadas bilateralmente foram as mais utilizadas devido suas concentrações elevadas de gonadotrofinas após a ovariectomia (GOSDEN et al., 1994; WOLVEKAMP et al., 2001). Possivelmente essa descompensação hormonal inicial pós ovariectomia ocasionou irregularidades no ciclo estral após os transplantes, pois, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG) das receptoras ainda não estava adaptado à nova gônada recentemente incorporada.

Em relação ao desenvolvimento folicular, nas últimas décadas, muitos sistemas de cultivo foram desenvolvidos com o objetivo de promover a ativação de folículos primordiais e o crescimento de folículos pré-antrais por autotransplante (SANTOS et al., 2009) e *in vitro* até a estarem aptos à utilização de fecundação *in vitro* na espécie caprina (MAGALHÃES et al., 2011), semelhantemente ao observado, verificou-se o desenvolvimento dos folículos até o estágio antral. Estudos em diferentes épocas constataram que folículos primordiais são ativados em torno do 73º dia e que folículos antrais já podem ser observados a partir do início do último terço de vida gestacional (BEZERRA et al., 1998) havendo entre esse período pequenas alterações na cinética da foliculogênese na fase pré-antral. A possibilidade de um desenvolvimento e diferenciação anteriores a interrelação do eixo HHG e a responsividade ovariana precoce à gonadotrofinas em fetos de cabra foram cogitadas recentemente em fetos caprinos (KUMARI et al., 2017), sendo possibilidades plausíveis principalmente quando a fonte de gonadotrofinas vem de outra espécie como a apresentada neste estudo.

A cinética do desenvolvimento folicular ficou evidenciada ao observar as proporções de foliculares entre os diferentes tratamentos e linhagens, sendo constatado o “follicular right shift”, fenômeno caracterizado pela diminuição do número de folículos primordiais e aumento gradativo de folículos primário, secundário e antral devido a ativação folicular após o xenotransplante (DOS SANTOS et al., 2016), mostrando que o cultivo *in vivo* por xenotransplante de ovário fetal caprino permite o desenvolvimento folicular normal.

O número de folículos viáveis foi menor após o transplante de tecido ovariano vitrificado em comparação com o transplante a fresco apenas no folículo antral da linhagem

C57BL6SCID. Sabe-se que as injúrias criogênicas podem afetar o desenvolvimento folicular, reduzindo a respiração celular, aumentando a degeneração do DNA e liberando material intracelular (LASCHKE et al., 2003). No entanto, o consenso atual é que a isquemia antes da neovascularização do transplante pode acarretar danos induzidos pela criopreservação, sendo esta, a principal causa de perda folicular (GONZÁLEZ et al., 2012). Nesta pesquisa, houve uma redução no adensamento folicular após a vitrificação, mas isso não foi impeditivo para que os folículos existentes em ambas as linhagens receptoras se desenvolvessem até folículos antrais, sendo estes possivelmente favorecidos pela menor competição por nutrientes.

A região subcapsular renal, como sítio receptor, oferece diversas vantagens para a manutenção do tecido transplantado: mesma origem embriológica do trato reprodutivo e o suporte vascular potencial em torno de 20 a 25% do débito cardíaco (CHRISTIE; BJORLING, 1998). Para este estudo, foi escolhido a região subcapsular renal como sítio receptor dos tecidos ovarianos por este sítio prevenir a extrusão do tecido ovariano para a cavidade abdominal. Outro motivo para a eleição deste local foi que o parênquima renal propicia uma melhor vascularização, pois evita o crescente distanciamento do tecido transplantado do suprimento sanguíneo, viabilizando a ativação folicular após o transplante mais rapidamente (AERTS et al., 2010).

Os resultados apresentados pela avaliação estereológica demonstram que o volume dos fragmentos, a densidade de volume e de área dos vasos da linhagem BALB/c NUDE foi menor no tecido ovariano transplantado após a criopreservação quando comparados ao tecido transplantado a fresco ( $p < 0,01$ ). Resultados melhores foram encontrados na linhagem C57BL6SCID, não havendo diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos, demonstrando que essa linhagem pode ser considerada como melhor receptora para tecidos transplantados após criopreservação comparada a BALB/c NUDE. Os estudos com a estereologia foram essenciais para demonstrar a eficácia do xenotransplante quanto à neovascularização dos fragmentos nos diferentes tratamentos. Os achados sobre a quantificação de folículos ovarianos após o transplante associados a vascularização conferiram a melhor performance de receptoras da linhagem C57BL6 SCID.

O estradiol dosado nas camundongas após o xenotransplante ovariano de feto de cabra encontrou-se dentro do esperado para espécie e linhagem (INGBERG et al., 2012). Na maioria das espécies o  $17\beta$ - estradiol é considerado o mais potente estrógeno natural produzido pelos ovários. Após uma fase de isquemia, o ovário de feto de cabra conseguiu revascularizar sob a cápsula renal e possivelmente induziu a reativação do eixo HHG das

receptoras e com isso, permitindo a produção maciça de  $17\beta$ - estradiol pelo fragmento implantado.

## **2.6. Conclusão**

O xenotransplante de tecido ovariano de feto caprino, a despeito de reduzir o número de folículos ovarianos disponíveis ainda proporciona o desenvolvimento folicular satisfatório e a restauração da função endócrina das receptoras, nas quais foram observadas todas as fases do ciclo estral.

Os folículos pré-antrais do tecido ovariano vitrificado caprino se desenvolveram e mantiveram viáveis após xenotransplante em camundongas C57BL6 SCID.



## REFERÊNCIAS

- AERTS, J. M. J. et al. Xenotransplantation by injection of a suspension of isolated preantral ovarian follicles and stroma cells under the kidney capsule of Nude mice. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 2, p. 708-714, 2010.
- AYUANDARI, S. et al. Follicular growth after xenotransplantation of cryopreserved/thawed human ovarian tissue in SCID mice: dynamics and molecular aspects. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 33, n. 12, p. 1585-1593, 2016.
- BAGUISI, A. et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nature biotechnology**, v. 17, n. 5, p. 456, 1999.
- BARROS, F. F. P. C. et al. Xenotransplante em camundongos imunossuprimidos coletado por meio de ovariectomia unilateral total vídeolaparoscópica em ovelha. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 121-126, 2014.
- BARTOSKOVA, A. et al. The effects of *in vitro* exposure to progesterone and estradiol-17 $\beta$  on the activity of canine neutrophils. **Veterinarni Medicina**, v. 59, n. 4, p. 202-209, 2014.
- BERTOLINI, L. R. et al. The transgenic animal platform for biopharmaceutical production. **Transgenic research**, v. 25, n. 3, p. 329-343, 2016.
- BEZERRA, M. B. et al. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v. 8, n. 2, p. 47-56, 1998.
- BYERS, S. L. et al. Mouse estrous cycle identification tool and images. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35538, 2012.
- CHRISTIE, B. A; BJORLING DE. R. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Manole; p. 1698 – 713, 1998.
- COMIZZOLI, P. Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. **Asian journal of andrology**, v. 17, n. 4, p. 640 - 645, 2015.
- COMIZZOLI, P.; WILDT, D. E. Mammalian fertility preservation through cryobiology: value of classical comparative studies and the need for new preservation options. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 1, p. 91-98, 2014.
- COMMIN, L. et al. Follicle development in cryopreserved bitch ovarian tissue grafted to immunodeficient mouse. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 3, p. 461-471, 2012.
- COOPER, R. L. Monitoring of the estrous cycle in the laboratory rodent by vaginal lavage. **Female reproductive toxicity**, 1993.
- DONFACK, N. J. et al. In vivo and *in vitro* strategies to support caprine preantral follicle development after ovarian tissue vitrification. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 8, p. 1055-1065, 2018.

DOS SANTOS, F. A. et al. Follicular right shift: Xenografting queens' ovarian tissue into severe combined immunodeficiency mice and its responses to exogenous gonadotropin. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1811-1817, 2016.

DURAWO, C. et al. Influence of genotype and topography on the goat predation challenge under communal production systems. **Small ruminant research**, v. 149, p. 115-120, 2017.

FONSECA, J. F. et al. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 144-151, 2016.

GASTAL, G. D. A. et al. Ovarian features in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) fawns and does. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0177357, 2017.

GONZÁLEZ, C. et al. Concise review: fertility preservation: an update. **Stem cells translational medicine**, v. 1, n. 9, p. 668-672, 2012.

GOSDEN, R. G. et al. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. **Journal of reproduction and fertility**, v. 101, n. 3, p. 619-623, 1994.

HAJIAN, M. et al. Comparative stepwise pattern of reactive oxygen species production during *in vitro* development of fertilized and nuclear transferred goat embryos. **International journal of fertility & sterility**, v. 11, n. 2, p. 93, 2017.

HOFF, Janet. Methods of blood collection in the mouse. 2000. <<http://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>> Acesso em 13 junho, 2018.

INGBERG, E. et al. Methods for long-term 17 $\beta$ -estradiol administration to mice. **General and comparative endocrinology**, v. 175, n. 1, p. 188-193, 2012.

KHAN, M. Z. et al. Livestock depredation by large predators and its implications for conservation and livelihoods in the Karakoram Mountains of Pakistan. **Oryx**, v. 52, n. 3, p. 519-525, 2018.

KUMARI et al. Morphometric and Histological Characterization of Goat Fetal Ovaries. **Journal of Dairy and Veterinary Sciences**, v. 3 n. 1, p. 01-07, 2017.

LASCHKE, M. W. et al. Cryopreservation does not affect neovascularization of freely transplanted ovarian follicles. **Fertility and sterility**, v. 79, n. 6, p. 1458-1460, 2003.

LEAL, E. S. S. et al. *In vitro* growth and development of isolated secondary follicles from vitrified caprine ovarian cortex. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 2, p. 359-370, 2018.

LEE, J. et al. Effects of three different types of antifreeze proteins on mouse ovarian tissue cryopreservation and transplantation. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126252, 2015.

LIU, L. et al. Restoration of fertility by orthotopic transplantation of frozen adult mouse ovaries. **Human reproduction**, v. 23, n. 1, p. 122-128, 2007.

- MAGALHÃES, D. M. et al. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 182–188, 2011.
- NOORAFSHAN, A. et al. Stereological study of the effects of letrozole and estradiol valerate treatment on the ovary of rats. **Clinical and experimental reproductive medicine**, v. 40, n. 3, p. 115-121, 2013.
- PELLICER-RUBIO, M. T. et al. Evaluation of hormone-free protocols based on the “male effect” for artificial insemination in lactating goats during seasonal anestrus. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 960-969, 2016.
- PRAXEDES, E. C. G. et al. Development of fresh and vitrified agouti ovarian tissue after xenografting to ovariectomized severe combined immunodeficiency (SCID) mice. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30, n. 3, p. 459-468, 2018.
- ROSHNATH, R. et al. Concerns about Wild Dog (*Cuon alpinus*) Predation on Livestock in the Fringes of Aralam Wildlife Sanctuary, Kannur, Kerala. **Indian Forester**, v. 143, n. 10, p. 1037-1041, 2017.
- SANTOS, R. R. et al. Complete follicular development and recovery of ovarian function of frozen-thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. **Fertility and sterility**, v. 91, n. 4, p. 1455-1458, 2009.
- SANTOS, R. R. et al. Cryopreservation of ovarian tissue: an emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal reproduction science**, v. 122, n. 3-4, p. 151-163, 2010.
- SARAIVA, M. V. A. et al. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. **Reproductive Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1135-1143, 2010.
- SOLEIMANI, R.; HEYTENS, E.; OKTAY, K. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e19475, 2011.
- TAHAELI, L. S. et al. Follicle development of xenotransplanted sheep ovarian tissue into male and female immunodeficient rats. **International journal of fertility & sterility**, v. 9, n. 3, p. 354 - 360, 2015.
- VAN EYCK, A. S. et al. Both host and graft vessels contribute to revascularization of xenografted human ovarian tissue in a murine model. **Fertility and sterility**, v. 93, n. 5, p. 1676-1685, 2010.
- WIEDEMANN, C. et al. Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s6, p. 300-304, 2012.
- WOLVEKAMP, M. C. J. et al. Follicular development in cryopreserved Common Wombat ovarian tissue xenografted to Nude rats. **Animal reproduction science**, v. 65, n. 1-2, p. 135-147, 2001.

YANG, M. et al. Oocytes from small and large follicles exhibit similar development competence following goat cloning despite their differences in meiotic and cytoplasmic maturation. **Theriogenology**, v. 86, n. 9, p. 2302-2311, 2016.

YOUM, H. W. et al. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and *in vitro* culture on vitrified–warmed ovarian tissue survival. **Human reproduction**, v. 29, n. 4, p. 720-730, 2013.

### 3. CAPÍTULO 3 – RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS DE TECIDO OVARIANO CAPRINO XENOTRANSPLANTADO SOB CÁPSULA RENAL DE DOIS MODELOS DE CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES RECEPTORES DO SEXO MASCULINO

#### 3.1. Resumo

**RESUMO** – O xenotransplante de tecido ovariano caprino representa uma ferramenta interessante para investigar o potencial reprodutivo em diferentes mamíferos domésticos, no entanto sua aplicabilidade em caprinos ainda necessita ser estudada. Portanto, o objetivo foi avaliar o desenvolvimento ovariano caprino após xenotransplante em dois modelos de camundongos imunodeficientes C57BL/6 SCID e BALB/c Nude. Para tanto, fragmentos ovarianos (1.0 mm<sup>3</sup>) de seis cabritas jovens foram xenotransplantados imediatamente após a colheita em dez receptores de cada linhagem. Após 65 dias do xenotransplante, os animais foram eutanasiados e os transplantes avaliados quanto às características microscópicas, por histologia clássica e desenvolvimento oocitário *in vitro*. Adicionalmente, o plasma sanguíneo foi recuperado dos receptores para a quantificação da concentração de 17 $\beta$  - estradiol e análises bioquímicas renais e hepáticas. Assim, folículos de todas as fases de desenvolvimento e sem alterações morfológicas foram observados nos transplantes recuperados, com expressiva cinética de desenvolvimento folicular em ambas as linhagens. Além disso, em um receptor BALB/c Nude, um oócito recuperado de folículo antral foi submetido a maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, sem contudo apresentar desenvolvimento embrionário. Nenhuma diferença foi observada nas dosagens bioquímicas, mas houve diferenças nas concentrações de 17 $\beta$  - estradiol entre as linhagens C57BL6 SCID e BALB/c Nude e seus respectivos controles. O xenotransplante de tecido ovariano caprino em camundongos machos imunossuprimidos permitiu, sem o uso de protocolos hormonais, a sobrevivência, o crescimento e o desenvolvimento de folículos antrais e a coleta de oócito.

Palavras-chave: Técnicas de Reprodução; folículo antral; estradiol; transplante ovariano

### 3.2. Introdução

Os caprinos assim como os demais mamíferos domésticos iniciam seu desenvolvimento pós-natal apresentando uma grande reserva de gametas femininos em seus folículos iniciais, dos quais apenas um ínfimo número atinge a maturação meiótica (AMORIM et al., 2016). Nesse sentido, o estoque desses folículos primordiais e primários representa um potencial inexplorado, que, ao ser cultivado adequadamente, permite sua aplicação em setores reprodutivos, produtivos, conservacionistas e científicos (AERTS et al., 2010).

Para garantir um cultivo adequado dessas células, o xenotransplante tem sido desenvolvido, especialmente para indivíduos de alto valor genético *post-mortem* (PIMENTEL et al., 2017) e em programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção (KIKUCHI et al., 2011). Assim, o xenotransplante permite avaliar a morfofisiologia dos folículos pré-antrais (ANTONINO et al., 2018; NÓBREGA et al., 2015), buscando conhecer os mecanismos associados à ativação e ao crescimento de folículos primordiais até os estádios subsequentes (KANEKO et al., 2013), e de modo mais aplicado, promover novas ferramentas de recuperação da fertilidade a partir do xenotransplante a fresco ou associado com a criopreservação do tecido gonadal (CUSHMAN et al., 2002). Entre as informações mais promissoras sobre o xenotransplante, foi verificado em suínos que, quando em combinação ao cultivo *in vitro* dos oócitos recuperados, este permite um completo desenvolvimento embrionário (KANEKO et al., 2013).

Assim, para garantir o sucesso de todas as etapas, é necessária a definição do local do transplante (YANG et al., 2006; KANEKO et al., 2013; AERTS et al., 2008; YOUM et al., 2014; LEE et al., 2015a; DOS SANTOS et al., 2016), bem como das características da linhagem receptora, como o gênero, realização de castração e imunossupressão induzida ou genética (HERNANDEZ-FONSECA et al., 2004). Todas essas características podem influenciar na qualidade do transplante e seu desenvolvimento final.

Baseado nos aspectos mencionados acima, o objetivo deste estudo foi investigar a viabilidade de conservar e desenvolver oócitos caprinos em dois modelos de camundongos machos imunodeficientes após o xenotransplante dos ovários caprinos.

### 3.3. Material e Métodos

Todos os procedimentos foram realizados em concordância com o Código Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1988) e sob a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFERSA, no. 23091006934/2015-73). Exceto quando indicado, todos os químicos e meios foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, EUA).

#### 3.3.1. Colheita de tecido ovariano caprino

Um total de doze ovários foi recuperado de fêmeas caprinas mestiças com idade de 6–8 meses provenientes de abatedouro local. Imediatamente após a colheita, ovários foram lavados e transportados ao laboratório em solução fisiológica (NaCl 0,9%) contendo 100 µg/mL de penicilina a 28°C dentro de 1 h. No laboratório, ovários foram fragmentados em 1.0 mm<sup>3</sup>, de acordo com Pimentel et al. (2017) e distribuídos aleatoriamente nos grupos grupo controle (não xenotransplantados) e xenotransplantados para a linhagem C57BL/6 SCID (grupo SCID) e BALB/c Nude (grupo NUDE). Todos os procedimentos realizados desde a colheita dos ovários até o transplante em camundongos receptores não excedeu 5 h.

#### 3.3.2. Camundongos receptores e xenotransplante

Antes do início do experimento, um total de vinte camundongos receptores (10 animais por linhagem) com 20 semanas de idade foram mantidos em condições estéreis, sob ciclo de luz/escuridão de 12 h a 22°C e alimentados *ad libitum*. Para o xenotransplante, receptores foram anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol a 2,5%, na dose de 18 mL/kg (grupo SCID) e 20 mL/kg (grupo NUDE), administrado intraperitonealmente. Após orquiectomia, cinco fragmentos de córtex ovariano da cabra doadora foram separados e inseridos delicadamente sob a cápsula renal esquerda dos receptores. Adicionalmente, quarenta receptores (20 animais por linhagem) que não receberam os fragmentos foram usados como grupo controle.

Após a inserção dos fragmentos foi verificada a ocorrência de anormalidades e na ausência dessas, os tecidos foram devolvidos à posição anatômica e a cavidade abdominal fechada. Finalmente, os animais foram acondicionados sob condições estéreis em mini isoladores aquecidos a 37°C até a completa recuperação anestésica, a qual foi identificada com o reaparecimento dos movimentos voluntários e deambulação espontânea.

### 3.3.3. Avaliação bioquímica renal e hepática e ensaio hormonal

As análises bioquímicas e hormonais foram realizadas a partir da colheita de plasma sanguíneo dos receptores. Brevemente, ao final do 65º dia do xenotransplante, no período matinal, camundongos foram anestesiados com 2,2,2 tribromoetanol por via intraperitoneal. Confirmado o plano anestésico de acordo com a ausência do reflexo podal, a punção cardíaca foi realizada sendo recuperados 1.0 mL de sangue (HOFF, 2000). Após esse procedimento, todos os receptores foram eutanasiados para a recuperação dos transplantes, sendo o óbito confirmado por meio da ausência de sinais vitais.

Para a obtenção do plasma sanguíneo, o sangue de cada indivíduo foi centrifugado (2000g por 10 min a 28°C) e as análises bioquímicas foram realizadas usando um analisador bioquímico semiautomático Bioplus-200<sup>®</sup>. Assim, a avaliação da função renal e hepática foi determinada por meio da dosagem de ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato Aminotransferase (AST) e fosfatase Alcalina (FAL), sendo utilizados kits comerciais Labtest<sup>®</sup>.

Para avaliação hormonal, as amostras foram analisadas em duplicata para determinação das concentrações sérica de 17 $\beta$  - estradiol usando quimioluminescência amplificada por meio de um sistema de imunoensaio (Vitros Eci/EciQ Immunodiagnostic System, Johnson e Johnson), de acordo com as instruções do fabricante e seguindo os métodos de Bartoskova et al. (2014).

### 3.3.4. Processamento histológico e avaliações macroscópicas e microscópicas

Amostras dos córtices ovarianos foram utilizadas como controles no dia do xenotransplante. Após a recuperação dos transplantes e aspiração de eventuais folículos antrais superiores a 2mm, os tecidos transplantados foram avaliados quanto a sua aparência macroscópica e fixados em solução de paraformaldeído a 4% em PBS por 24 h. Em seguida, os tecidos foram desidratados, diafanizados, incluídos em parafina e seccionados semi-seriada a 5,0  $\mu$ m, sendo montada uma secção a cada 60  $\mu$ m. Posteriormente, os fragmentos foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM), visando à avaliação da morfologia folicular e suprimento vascular, respectivamente (LEE et al., 2015b; HERNÁNDEZ-MORERA et al., 2016).

Assim, os fragmentos ovarianos foram avaliados quanto à integridade de seu parênquima, qualidade e classificação dos folículos ovarianos pré-antrais (em suas categorias)



e antrais, bem como vascularização e agregação das células do mesênquima. Os folículos foram classificados em primordial, primário, secundário e antral, de acordo com Rimon-Dahari et al. (2016).

### 3.3.5. Recuperação e cultivo *in vitro* oocitário

Após a aspiração dos folículos antrais, um oócito foi recuperado e lavado em meio Tyrode-albumina-lactato-piruvato tamponado com HEPES (TALP-HEPES) e suplementado com 3 mg/mL de BSA e 40 µg/mL de sulfato de gentamicina. Em seguida, o oócito foi avaliado quanto à homogeneidade do citoplasma, compactação e número de camadas de células do *cumulus*. Após a classificação oocitária, o mesmo foi submetido à maturação *in vitro* (MIV) em meio TCM199 suplementado com 20 µg/mL de FSH/LH, 100 µM de cisteamina, e 40 µg/mL de sulfato de gentamicina por 24 h a 38,5°C, com umidade saturada e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

Após esse período, o oócito foi avaliado quanto à expansão das células do *cumulus* e submetido à fecundação *in vitro* (FIV) usando  $2.0 \times 10^6$  espermatozoides/mL criopreservados e capacitados em meio FERT (RIZOS et al., 2002) por 18 h nas mesmas condições de cultivo descritas para a MIV. Finalmente, após a FIV, o presumível zigoto foi incubado por dois dias em meio Charles Rosenkrans 2 (CR2) suplementado 1.0 mg/mL de BSA e 10% de soro fetal bovino (SFB) e avaliado quanto ao número de blastômeros após esse período.

### 3.3.6. Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão e avaliados usando o software BioEstat 5.0. Os dados de proporções foliculares foram analisados pelo teste do qui-quadrado, enquanto os dados de dosagem hormonal e análises bioquímicas foram comparados usando análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey. Os demais dados foram apresentados descritivamente e comparações entre os grupos foram realizadas considerando  $P < 0,05$ .

## 3.4. Resultados

### 3.4.1. Avaliação bioquímica sérica e hormonal

Nenhuma diferença foi observada nas dosagens bioquímicas entre as linhagens C57BL6 SCID e BALB/c Nude para os níveis de ALT, AST, FAL, UR e CR (Tabela 1). Quanto à dosagem de  $17\beta$  - estradiol, foi observado diferença entre os grupos de cada linhagem (Tabela 2).

Tabela 1 – Valores plasmáticos da função renal e hepática de camundongos imunodeficientes submetidos ou não ao xenotransplante ovariano caprino.

Linhagens	Grupos	Parâmetros				
		UR (mg/dL)	CR (mg/dL)	ALT (u/L)	AST (u/L)	FAL (u/L)
C57BL6 SCID	Controle n = 20	58,8 ± 4,5	0,4 ± 0,1	117,3 ± 1,7	155,9 ± 7,5	187,5 ± 8,9
	Xenotransplantados n = 10	57,0 ± 5,2	0,4 ± 0,1	119,1 ± 1,1	148,2 ± 8,6	183,2 ± 7,5
BALB/c Nude	Controle n = 20	59,9 ± 4,9	0,4 ± 0,1	115,4 ± 0,7	156,6 ± 8,3	188,6 ± 9,5
	Xenotransplantados n = 10	60,4 ± 6,2	0,4 ± 0,1	118,5 ± 0,4	156,8 ± 9,7	187,6 ± 9,6

P > 0,05.

Tabela 2 – Concentração plasmática média de  $17\beta$  - estradiol em camundongos SCID e NUDE após xenotransplante de tecido ovariano caprino sob a cápsula renal.

Linhagem	Grupos	Estradiol (pg/mL)
C57BL6 SCID	Controle n = 20	24,13 ± 5,89 <sup>ba</sup>
	Xenotransplantado n = 10	50,5 ± 5,3 <sup>aA</sup>
BALB/c Nude	Controle n = 20	28,09 ± 4,19 <sup>ba</sup>
	Xenotransplantado n = 10	54,8 ± 7,3 <sup>aA</sup>

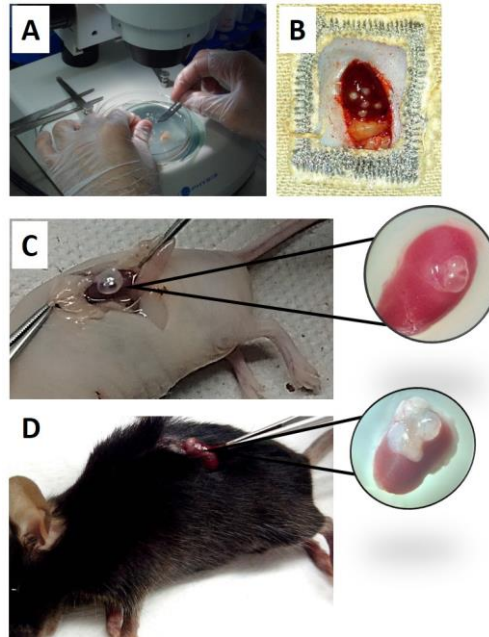
Letras minúsculas comparam os grupos entre a mesma linhagem. Letras maiúsculas comparam o grupo entre linhagens diferentes. (p > 0,05).

#### 3.4.2. Avaliações macroscópicas

Durante a recuperação dos transplantes, pode-se observar macroscopicamente o desenvolvimento e agregação dos cinco fragmentos transplantados (5 x 1,0 mm<sup>3</sup>) previamente transplantados, que aumentaram de tamanho (Figura 1). Este desenvolvimento dos fragmentos e possível ativação folicular foram confirmados pela avaliação histológica, constatando assim,

que houve desenvolvimento do tecido transplantado em todos os receptores de ambas as linhagens.

Figura 1 – Macroscopia dos fragmentos de córtex ovariano de cabra antes, durante e após o procedimento de xenotransplante.



A: córtex ovariano durante a fragmentação antes do xenotransplante. B: D0 - fragmentos do córtex ovariano após a inserção sob a cápsula renal do receptor. C: Fragmento de córtex ovariano de cabra coletado 65 dias após o xenotransplante em receptores masculinos imunodeficientes Balb-c Nude. D: Fragmento do córtex ovariano caprino coletado 65 dias após o xenotransplante em receptores masculinos imunodeficientes C57BL6 SCID.

### 3.4.3. Avaliações microscópicas

Após o xenotransplante foi observado o desenvolvimento folicular de tecido ovariano caprino em receptores imunodeficientes, com alteração na cinética do desenvolvimento folicular e aumento de folículos antrais em ambas as linhagens (Tabela 3), quando comparado ao grupo controle (fragmentos não xenotransplantados).

Tabela 3 - Proporção folicular (%) de xenotransplante de ovário de caprino sob a cápsula renal de camundongos machos da linhagem C56BL6 SCID e BALB-C NUDE.

RECEPTORES	Total de	CATEGORIA FOLICULAR (%)			
		PP	P	S	A

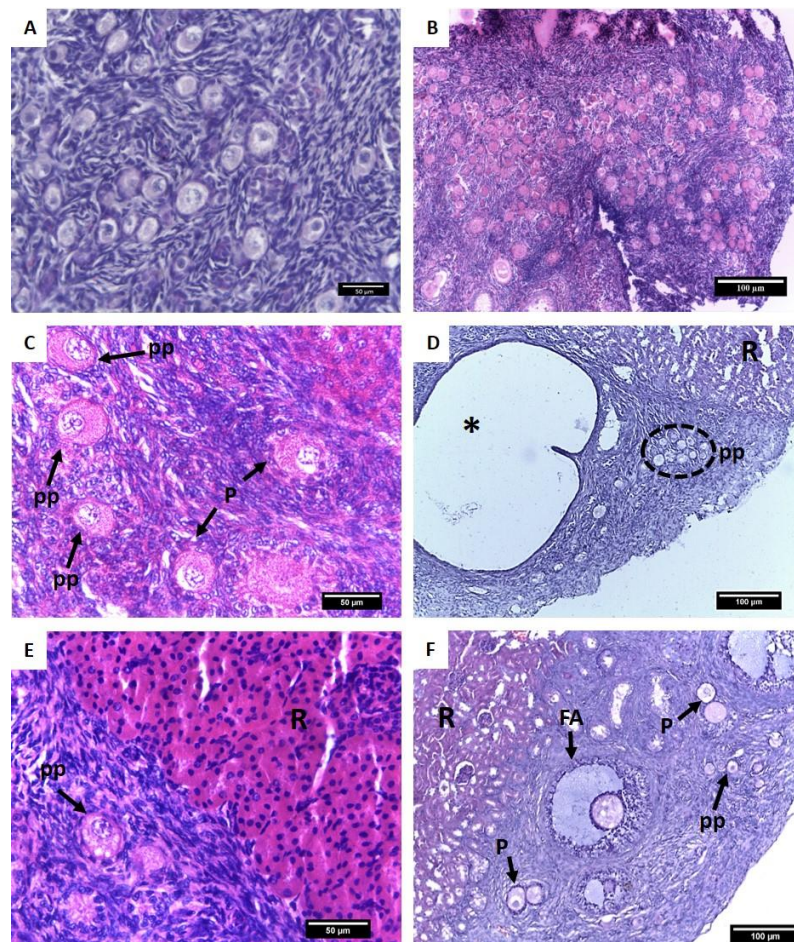
	folículos				
Controle	n = 1573	84,3 ± 3,5 <sup>a</sup>	14,7 ± 2,8 <sup>b</sup>	0,8 ± 1,0 <sup>b</sup>	0 ± 0,0 <sup>b</sup>
NUDE	n = 570	50,3 ± 4,5 <sup>b</sup>	29,7 ± 5,7 <sup>b</sup>	11,3% ± 2,6 <sup>a</sup>	8,7 ± 5,6 <sup>a</sup>
SCID	n = 517	47,1 ± 3,1 <sup>b</sup>	31,5 ± 4,7 <sup>a</sup>	12,7% ± 2,2 <sup>a</sup>	8,8 ± 2,2 <sup>a</sup>

Letras minúsculas comparam o grupo controle com cada tratamento, na mesma coluna.

Controle: não xenotransplantado. Diferenças foram observadas em todas as categorias de folículos entre o controle e as linhagens ( $P < 0,05$ ).

Além disso, foram observados folículos em diferentes fases de desenvolvimento e sem alterações morfológicas nos transplantes recuperados (Figura 2).

Figura 2 – Fotomicrografias de ovário caprino antes e após o xenotransplante em receptores machos imunodeficientes usando coloração de hematoxilina-eosina.

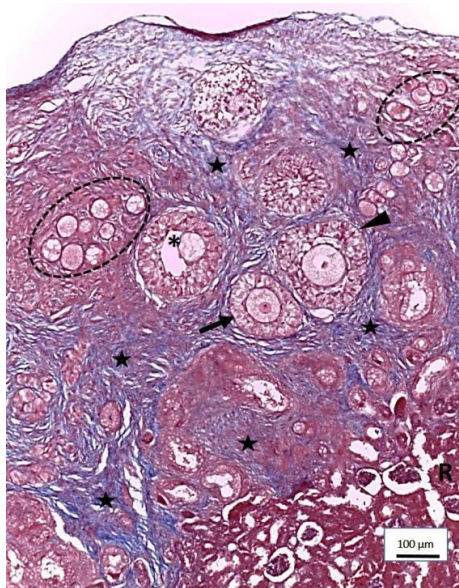


A: fragmento de ovário controle de caprino jovem com folículos primordiais. 40X. B: fragmento de ovário controle de caprino jovem com folículos primordiais. 10X. C: fragmento ovariano do xenotransplante da linhagem Balb-c Nude com folículo primordial (pp) e folículo primário (P). 40X. D: fragmento ovariano do xenotransplante da linhagem Balb-c Nude com

folículos primordiais (círculo pontilhado), folículo antral pós-aspiração do oócito (\*), região renal do receptor (R); 10X. E: fragmento ovariano do xenotransplante da linhagem C57BL6 SCID com folículo primordial (pp) e região renal do receptor (R). 40X. F: fragmento ovariano do xenotransplante da linhagem C57BL6 SCID com folículo primordial (círculo pontilhado), folículo primário (P), folículo antral (FA) e região renal do receptor (R). 10X.

Após 65 dias de xenotransplante, o fornecimento vascular oferecido pelo rim dos receptores aos fragmentos do córtex ovariano das doadoras foi considerado morfológicamente semelhante àquele existente no ovário *in situ* das doadoras, ocorrendo a neovascularização em 100% dos animais transplantados da linhagem C57BL6 SCID e em 100% das BALB/c Nude. Além disso, foram observados vasos sanguíneos nos transplantes recuperados (Figura 3) com numerosa quantidade de folículos desde primordiais até presença de folículos antrais circundando essa revascularização.

Figura 3 – Fotomicrografia de vasos sanguíneos observados no tecido ovariano caprino após xenotransplante em receptores machos usando coloração de tricrômico de Masson.



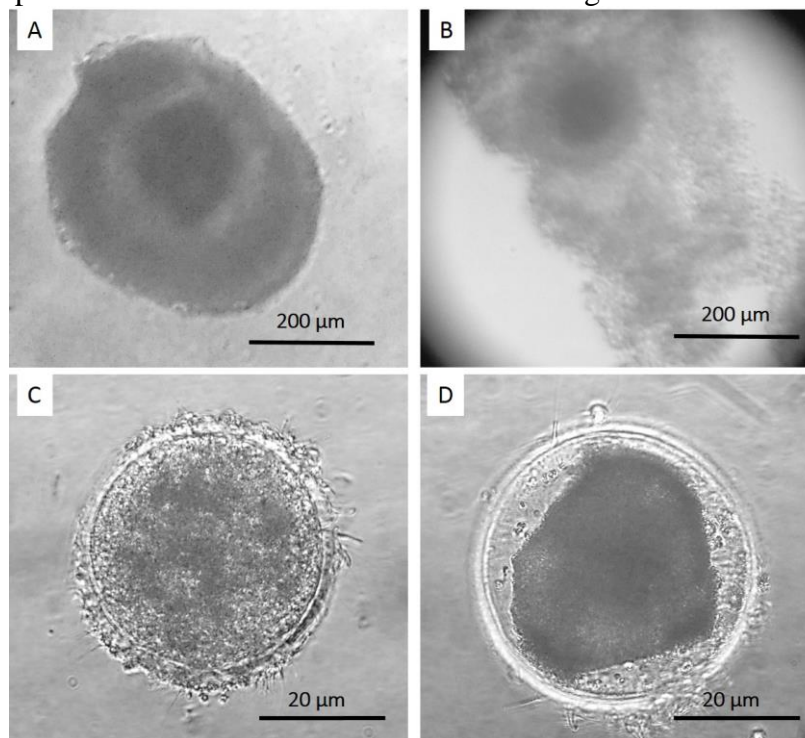
Estrelas apontam tecido conjuntivo, demonstrando vascularização por todo o tecido; círculo vasado e ponteados identificam folículos primordiais e primários; seta indica folículo secundário; cabeça de seta apontando folículo antral inicial e asterisco mostrando presença de folículo antral; R: região renal do receptor.

#### 3.4.4. Recuperação e cultivo *in vitro* oocitário

Após a retirada do transplante, os folículos antrais de maior diâmetro foram aspirados e um oócito foi recuperado, sendo categorizado como grau I (citoplasma marrom com

granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida, e circundado com mais de duas camadas de células do *cumulus* compactas, Figura 4A). Após 24 h de MIV, uma evidente expansão das células do *cumulus* foi observada (Figura 4B). Morfologicamente normal após a FIV por 18 h (Figura 4C), nenhuma clivagem foi observada após 48 h de cultivo *in vitro* (Figura 4D).

Figura 4 – Cultivo *in vitro* de um oócito recuperado após xenotransplante de tecido ovariano caprino em receptores masculinos imunodeficientes da linhagem BALB/c Nude.



A: oócito recuperado após 65 dias de xenotransplante ovariano caprino em camundongo macho; B: oócito apresentando evidente expansão do *cumulus* após a MIV; C: oócito após 18 h de FIV com espermatozoides ligados a zona pelúcida; D: presumível zigoto degenerado após 48 h de cultivo *in vitro*.

### 3.5. Discussão

O presente estudo evidenciou o desenvolvimento até folículos antrais após o xenotransplante de tecido ovariano em camundongos machos imunodeficientes, sendo verificada presença de folículos antrais sem o uso de estímulos hormonais nos receptores. Oktay et al. (1998) afirmaram que folículos primordiais e primários podem ser desenvolver independente do estímulo de FSH. Contudo, após a formação de duas camadas de células foliculares cuboides, o FSH torna-se obrigatório para a obtenção de um maior crescimento folicular (AERTS et al., 2010). Além disso, o desenvolvimento de folículos antrais durante a

fase ovulatória é dependente das secreções de FSH e LH pelas células gonadotróficas da adeno-hipófise (APOLLONI et al., 2016). Portanto, provavelmente, o eixo hipotalâmico-hipofisário dos receptores após o xenotransplante, foi responsivo ao tecido ovariano caprino, resultando na produção das gonadotrofinas e retomada do desenvolvimento e ativação folicular até a formação de antro considerável.

Embora a recuperação de oócitos possa ocorrer espontaneamente (SENBON et al., 2003) a maioria dos estudos tem demonstrado obtenção de oócitos a partir de indução hormonal (SENBON et al., 2005; KANEKO et al., 2003; KANEKO et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016). Todos esses relatos ocorreram em receptores fêmeas. Até o presente momento desconhecemos dados sobre obtenção de oócitos a partir de tecidos ovarianos transplantados em machos e sem estímulo hormonal.

Não foi observada diferença de desenvolvimento folicular nos tecidos corticais xenotransplantados em ambas as linhagens e condições de imunossupressão dos receptores machos, e os tecidos transplantados alteraram a cinética normal de desenvolvimento folicular. Este fenômeno, descrito como “desvio folicular à direita” (DOS SANTOS et al., 2016) mostra a ocorrência da ativação folicular após o xenotransplante com aumento significativo de folículos antrais.

Estudo anterior relatou que um dos principais obstáculos é a capacidade dos folículos primordiais se desenvolverem após o xenotransplante e produzirem oócitos viáveis (GOSDEN et al., 1994). Entretanto, estudos posteriores demonstraram essa possibilidade em bovinos (SENBON et al., 2003; SENBON et al., 2005), suínos (KANEKO et al., 2003; KANEKO et al., 2013) e felinos (DOS SANTOS et al., 2016), todos em receptores imunossuprimidos. No presente estudo, demonstrou-se a recuperação de um oócito viável de cabra em machos e subsequente maturação *in vitro*.

Em geral, oócitos caprinos são classificados em uma escala de 1 a 4, considerando as características das células do *cumulus* e do citoplasma. No presente trabalho, o oócito aspirado apresentou *cumulus* compacto com mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas que preenchem o interior da zona pelúcida e coloração marrom, características preconizadas para oócitos de qualidade 1 (STRINGFELLOW; GIVENS, 2010) e que podem ser usadas para as subseqüentes etapas de cultivo (NUNES et al., 2010). Apesar de observada a expansão das células do *cumulus* após a MIV, não foi observado o desenvolvimento embrionário. Entre as razões deste resultado podem ser enumerados o reduzido número de oócito colocado em cultivo, o qual sendo realizado individualmente não alcançou a ativação embrionária.

Quanto aos receptores usados no presente estudos, os mesmos foram orquiectomizados antes do xenotransplante com o intuito de se obter altos níveis de gonadotrofinas circulantes, podendo auxiliar na reativação da atividade ovariana do transplante. Em outros estudos, os machos, intactos ou castrados, também foram usados como receptores (HERNANDEZ-FONSECA et al., 2004; WEISSMAN et al., 1999). Modelos animais gonadectomizados são preferidos, pois concentrações elevadas de gonadotrofinas logo após a castração são consideradas benéficas para a sobrevivência do transplante e o desenvolvimento folicular (LI et al., 2010). Até o presente momento é questionado qual o melhor gênero do receptor (macho ou fêmea) para receber a gônada do doador, pois camundongos machos com altas concentrações de andrógenos foram melhores hospedeiros para o desenvolvimento de folículos em crescimento do que camundongas fêmeas (TAHAEI et al., 2015). Outros estudos sugerem que a produção de andrógenos do receptor poderia atuar como um substrato para o estrogênio e consequentemente auxiliar o desenvolvimento dos folículos antrais (BOSCH et al., 2004; HERNANDEZ-FONSECA et al., 2004), sendo utilizado então, receptores não castrados. Contudo, no presente estudo, com o uso de animais castrados, resultados satisfatórios foram obtidos quanto ao desenvolvimento folicular e neovascularizaçãodo transplante, o que sugere que a influência maior do sucesso do transplante mais na técnica do que no gênero para que a gônada da doadora volte a exercer suas funções fisiológicas.

Adicionalmente, foi observado que, com a manutenção das características morfológicas após o xenotransplante ovariano em receptores machos e a maior exposição aos androgênios, acredita-se que imediatamente após a orquiectomia dos receptores seus níveis plasmáticos de testosterona circulante auxiliaram no desenvolvimento dos folículos pré-antrais do transplante, já que os androgênios são precursores dos estrogênios que possui ações endócrinas mais efetivas no gênero feminino, principalmente a nível parácrino e autócrino no ovário, particularmente no folículo em desenvolvimento (RODRIGUES et al., 2014). Adicionalmente, em sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos de camundongos, a exposição a androgênios também mostrou resposta semelhante em relação ao desenvolvimento de folículos pré-antrais e tamanho do diâmetro folicular (MURRAY et al., 1998). Sem a resposta hormonal alguns dias após a orquiectomia e ao xenotransplante, o eixo hipotalâmico-hipofisário dos receptores que antes apenas respondia aos estímulos hormonais do receptor, passaram a ser influenciados por uma combinação de testosteronas residuais do receptor e recém produzidos pela doadora, e posteriormente, apenas da doadora na corrente sanguínea passaram a ser convertidos em estradiol. Isso ocorre em devido à testosterona poder



seguir três caminhos: atuar no organismo, converter-se em di-hidrotestosterona através da 5  $\alpha$ -redutase ou ser convertida em estradiol (E2) pela P450 aromatase, sendo que ambas as conversões são realizadas nas células da granulosa, do folículo. Por essas razões, justificam-se os níveis elevados de estradiol, após o transplante dos animais em ambas as linhagens.

Finalmente, ensaios bioquímicos que demonstrem o grau de comprometimento hepático e renal associado aos dados comportamentais permitem uma caracterização do quadro clínico do animal transplantado, avaliando com isso, se o xenotransplante ocasionou algum dano ao receptor. Com a avaliação da função renal e hepática dos receptores pôde-se verificar a viabilidade desses órgãos após a realização do transplante, não havendo alteração dos animais transplantados em relação aos animais controle. Ressalta-se a importância dessa análise, pois tais informações permitem conhecer o estado geral dos receptores, podendo afirmar que o xenotransplante ovariano sob a cápsula renal não altera as condições fisiológicas dos camundongos (PIMENTEL et al., 2017), podendo inclusive ser um indicativo indireto de bem estar dos animais.

### **3.6. Conclusão**

O xenotransplante de tecido ovariano de caprino em camundongos imunossuprimidos permitiu, sem tratamento hormonal, o desenvolvimento de folículos antrais e coleta de oócitos.

## REFERÊNCIAS

- AERTS, J. M. J et al. Xenotransplantation by injection of a suspension of isolated preantral ovarian follicles and stroma cells under the kidney capsule of Nude mice. **Fertility and sterility**, v. 94, n. 2, p. 708-714, 2010.
- AMORIM, C. A. et al. Morphometric characteristics of preantral and antral follicles and expression of factors involved in folliculogenesis in ovaries of adult baboons (*Papio anubis*). **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 33, n. 5, p. 617–626, 2016.
- ANTONINO, D. D. C., et al. Morfometria de ovários de fetos bovinos: isolamento e quantificação de folículos pré-antrais. **Revista Uningá**, v. 52, n. 1, 2018.
- APOLLONI, L. B. et al. Papel dos andrógenos na foliculogênese em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-15, 2016.
- BARTOSKOVA, A. et al. The effects of *in vitro* exposure to progesterone and estradiol-17 $\beta$  on the activity of canine neutrophils. **Veterinarni Medicina**, v. 59, n. 4, p. 202 - 209, 2014.
- BOSCH, P. et al. Development of antral follicles in cryopreserved cat ovarian tissue transplanted to immunodeficient mice. **Theriogenology**, v. 61, n. 2, p. 581-594, 2004.
- DOS SANTOS, F. A. et al. Follicular right shift: Xenografting queens' ovarian tissue into severe combined immunodeficiency mice and its responses to exogenous gonadotropin. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1811-1817, 2016.
- CUSHMAN, R. A.; WAHL, C. M.; FORTUNE, J. E. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: A model for studies on the activation of primordial follicles. **Human Reproduction**. v.17, n. 1, p. 48-54. 2002.
- HERNANDEZ-FONSECA, H. et al. Effect of site of transplantation on follicular development of human ovarian tissue transplanted into intact or castrated immunodeficient mice. **Fertility and sterility**, v. 81, p. 888-892, 2004.
- HERNÁNDEZ-MORERA, Pablo et al. Quantification and Statistical Analysis Methods for Vessel Wall Components from Stained Images with Masson's Trichrome. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. e0146954, 2016.
- HOFF, Janet. Methods of blood collection in the mouse. 2000. <<http://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>> Access on Jun 13, 2018.
- GOSDEN, R. G. et al. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. **Journal of reproduction and fertility**, v. 101, n. 3, p. 619-623, 1994.
- KANEKO, H. et al. Improved developmental ability of porcine oocytes grown in Nude mice after fusion with cytoplasmic fragments prepared by centrifugation: A model for utilization of primordial oocytes. **Theriogenology**, v. 80, n. 8, p. 887-892, 2013.

- KANEKO, Hiroyuki et al. Maturation and fertilization of porcine oocytes from primordial follicles by a combination of xenografting and in vitro culture. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 5, p. 1488-1493, 2003.
- KIKUCHI, K. et al. Xenografting of gonadal tissues into mice as a possible method for conservation and utilization of porcine genetic resources. **Animal science journal**, v. 82, n. 4, p. 495-503, 2011.
- LEE, Jaewang et al. Effects of three different types of antifreeze proteins on mouse ovarian tissue cryopreservation and transplantation. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126252, 2015a.
- LEE, Jaewang et al. Effect of preoperative simvastatin treatment on transplantation of cryopreserved-warmed mouse ovarian tissue quality. **Theriogenology**, v. 83, n. 2, p. 285-293, 2015b.
- LI, F. et al. Follicle growth and oocyte development after ovary transplantation into back muscle of immune-intact adult castrated male mice. **Reproduction**, v. 140, n. 3, p. 465-476, 2010.
- MURRAY, A. A. et al. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing *in vitro*. **Journal of reproduction and fertility**, v. 113, n. 1, p. 27-33, 1998.
- NÓBREGA J. R, et al. Participação da esfingosina 1-fosfato e do fator inibidor da leucemia no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 75-79, 2015.
- NUNES, J. F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução de Pequenos Ruminantes**. 1 ed. 437 Fortaleza. Tecnograf, 2010.
- OKTAY, K. et al. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 13, n. 5, p. 1133-1138, 1998.
- PIMENTEL, M. M. L. et al. Biochemical, thermographic, and follicular responses of murine models of hormone-treated bovine ovarian renal capsule xenografts. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 425-431, 2017.
- RIMON-DAHARI, N. et al. Ovarian Folliculogenesis. In: *Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*. Springer International Publishing. v. 58, p. 167, 2016.
- RIZOS, D. et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular reproduction and development**, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.
- RODRIGUES, J. K. et al. Papel local dos androgênios no desenvolvimento de folículos pré-antrais de primatas não humanos cultivados individualmente em matriz tridimensional. **Reprodução & Climatério**, v. 29, n. 3, p. 93-104, 2014.
- SENBON, Shoichiro et al. Fertilization and development of bovine oocytes grown in female SCID mice. **Zygote**, v. 13, n. 4, p. 309-315, 2005.

SENBON, Shoichiro et al. Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. **Zygote**, v. 11, n. 2, p. 139-149, 2003.

STRINGFELLOW, D. A.; GIVENS, M. D. Manual of the international Embryo Transfer Society. **Internacional Embryo Transfer Society**, p.200, 2010.

TAHAEI, L. S. et al. Follicle development of xenotransplanted sheep ovarian tissue into male and female immunodeficient rats. **International journal of fertility & sterility**, v. 9, n. 3, p. 354 - 360, 2015.

WEISSMAN, Ariel et al. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 6, p. 1462-1467, 1999.

YANG, Hsiao Yun et al. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. **Reproduction**, v. 131, n. 5, p. 851-859, 2006.

YOUM, Hye Won et al. Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival. **Human reproduction**, v. 29, n. 4, p. 720-730, 2013.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

- O xenotransplante ovariano já foi realizado em algumas espécies, porém, ainda são necessários mais estudos para entender a fisiologia da interação doador/receptor e como isso pode influenciar na foliculogênese.
- Pode-se observar que é possível ativar os folículos pré-antrais dos ovários de caprinos (feto e animal jovem) otimizando o aproveitamento e conservação do germoplasma de caprinos em camundongos imunossuprimidos das linhagens C57BL/6 SCID e BALB/c Nude, em fêmeas e machos com gônadas removidas,
- Obteve-se nesta tese, uma resposta positiva quanto ao gênero de receptores utilizados, havendo um desenvolvimento folicular progressivo. Todavia, receptores machos imunossuprimidos, tiveram uma resposta melhor pois neles houve a recuperação de oócito viável.
- O não uso de hormônio exógeno nos experimentos e a castração previa dos receptores de ambos os gêneros, nos leva a creditar os transplantes conseguiram reativar o eixo hipotalâmico hipofisário gonadal do receptor, fazendo com que o mesmo voltasse a liberar hormônios que auxiliaram no desenvolvimento do transplante.
- A criopreservação após o xenotransplante demonstrou resultados promissores com o protocolo utilizado, pois mesmo após a técnica, foi observado o fenômeno Follicular right shift.
- As linhagens imunossuprimidas de camundongos Balb-s Nude e C57BL6/SCID utilizadas como receptoras nesse estudo foram consideradas excelentes para a realização da técnica de xenotransplante ovariano.
- Após todos os resultados promissores desta tese, acreditamos que a técnica de xenotransplante ovariano caprino em diferentes gêneros dos receptores e utilizando tecido ovariano de doadoras em diferentes idades possui viabilidade.
- Após alcançar o desenvolvimento folicular completo com a técnica do xenotransplante ovariano em caprinos com a recuperação de oócito, o próximo passo é aperfeiçoar mais ainda a técnica para se obter embriões. Para tanto, nos próximos estudos, podem ser utilizados estímulos hormonais exógenos para induzir uma superovulação do tecido do doador no transplante no intuito de se obter oócitos suficientes e viáveis para realização da PIVE
- Novos protocolos de criopreservação devem ser estudados, a fim de se obter resultados ainda melhores com essa técnica após o xenotransplante.

**ANEXOS**

**Anexo 1 - Comunicado da Submissão do 1º Artigo/Capítulo II**

# Submission Confirmation

---



Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Reproduction, Fertility and Development

**Manuscript ID**

RD18383

**Title**

Rescue of caprine fetal ovaries, vitrification and follicular development after xenotransplantation in two immunodeficient mice models

**Authors**

Pimentel, Muriel

Santos, Fernanda

de Macêdo, Luã

De Brito, Pamênedes

Lima, Gabriela

Barreto Júnior, Raimundo

Bezerra, Marcelo

**Date Submitted**

19-Sep-2018

**Anexo 2 - Comunicado da Submissão do 2º Artigo/Capítulo III**

# Submission Confirmation

 Print

---

Thank you for your submission

---

**Submitted to**

Reproduction in Domestic Animals

**Manuscript ID**

RDA-OA-Sep-2018-0437

**Title**

Oocyte recovery from goat ovarian tissue xenografted under renal capsule of two male recipient immunodeficient mice models

**Authors**

Pimentel, Muriel

Dos Santos, Fernanda

de Macêdo, Luã

Fernandes Pereira, Alexandra

bezerra, marcelo

**Date Submitted**

24-Sep-2018